

THÈSE

DE DOCTORAT D'ÉTAT ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

présentée

A LA FACULTÉ DES SCIENCES

D'ORSAY

UNIVERSITÉ DE PARIS

par

Radhouane ELLOUZ

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ÈS-SCIENCES

Sujet de la Thèse

SUR LA BIOSYNTHÈSE DE LA CHAÎNE LATÉRALE DE DEUX STÉROLS DU
MYXOMYCÈTE DICTYOSTÉLIUM DISCOIDEUM : LE STIGMASTANOL ET LE
STIGMASTEN-22, OL-3B.

Soutenue le 13 novembre 1970 devant la Commission d'Examen

MM. E. LEDERER

Président

J.F. BIELLMANN

M. FETIZON

Mme M. LENFANT

} Examineurs

THÈSE

DE DOCTORAT D'ÉTAT ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

présentée

A LA FACULTÉ DES SCIENCES

D'ORSAY

UNIVERSITÉ DE PARIS

par

Radhouane ELLOUZ

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ÈS-SCIENCES

Sujet de la Thèse

SUR LA BIOSYNTÈSE DE LA CHAÎNE LATÉRALE DE DEUX STÉROLS DU
MYXOMYCÈTE DICTYOSTÉLIUM DISCOIDEUM : LE STIGMASTANOL ET LE
STIGMASTEN-22, OL-3B.

Soutenue le 13 novembre 1970 devant la Commission d'Examen

MM. E. LEDERER

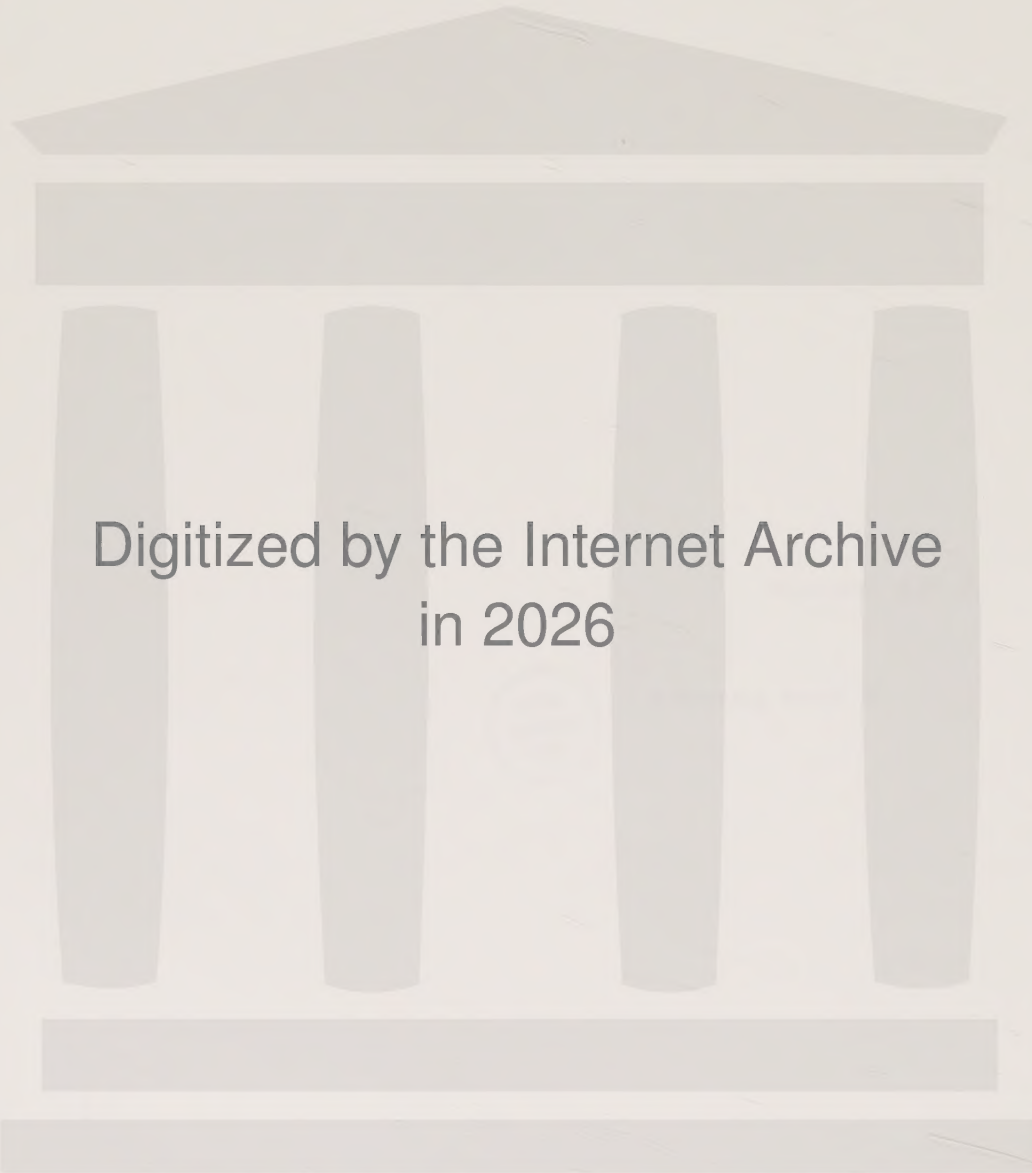
Président

J.F. BIELLMANN

M. FETIZON

Mme M. LENFANT

} Examineurs



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549902_0021

Cette thèse a été réalisée à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles, Centre National de la Recherche Scientifique, 91-Gif-sur-Yvette, dans le laboratoire de Monsieur le Professeur E.Lederer, sous la direction de Madame M.Lenfant, Chargée de recherche au C.N.R.S.

Monsieur le Professeur E.Lederer

Je vous prie de bien vouloir trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour m'avoir accueilli dans votre Institut, pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail et pour l'honneur que vous me faites en acceptant de présider le jury de cette thèse.

Madame Maryse Lenfant

Je tiens tout particulièrement à vous adresser mes remerciements et à vous exprimer ma gratitude pour m'avoir communiqué votre enthousiasme pour la recherche et n'avoir cessé, au cours de mon travail, de me prodiguer vos conseils judicieux.

Je remercie Monsieur J.F. Biellmann, Maître de recherche au C.N.R.S., et Monsieur le Professeur M. Fétizon d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

J'adresse mes remerciements à Monsieur B.C. Das pour l'interprétation des spectres de masse et à son service pour les nombreux spectres effectués pour ce travail.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur H. Felkin et à ses collaborateurs pour les fructueuses discussions que nous avons eues ensemble.

J'adresse mes remerciements à Mademoiselle E. Zissmann et au service de Microbiologie pour avoir effectué les cultures de Dictyostelium discoïdeum.

Je remercie également tous mes camarades de laboratoire et en particulier Monsieur P.F. Hunt pour l'aide efficace qu'ils m'ont apportée.

Publications parues :

"Sur la biosynthèse de la chaîne latérale éthyle des stérols du myxomycète Dictyostelium discoideum"

M.Lenfant, R.Ellouz, B.C.Das, E.Zissmann et E.Lederer
Europ.J.Biochem., 7, 159 (1969)

"Sur la formation in vivo de la double liaison en position 22, 23 d'un stérol de Dictyostelium discoideum"

R.Ellouz et M.Lenfant
Tetrahed.Let., 609 (1969)

"Transformation du stigmastanol en stigmasten-22, 21-3 β par Dictyostelium discoideum"

R.Ellouz et M.Lenfant
Tetrahed.Let., 2655 (1969)

"Sur deux voies de biosynthèse du stigmasten-22, 21-3 β de Dictyostelium discoideum"

R.Ellouz et M.Lenfant
Tetrahed.Let., 3967 (1970)

INTRODUCTION

Une grande variété de substances naturelles possède des groupements CH_3 dont l'origine biogénétique diffère de celle du reste du squelette carboné. Fixés sur des atomes de carbone, d'oxygène, d'azote ou de soufre, ces groupes méthyles ont comme précurseur biogénétique la méthionine 1.

En 1954, Birch et coll. (1) ont émis, les premiers, l'hypothèse du transfert du groupe CH_3 de cet acide aminé sur des atomes de carbone insaturé et l'ont démontré, par la suite, dans le cas de l'acide mycophénolique (2). A la même époque, Alexander et coll. (3) ont montré que la ramification C-24 méthyle de la chaîne latérale de l'ergostérol provient de la méthionine et Parks (4) a montré que, l'agent des transméthylations biologiques est la S-adénosyl méthionine 3 (pour les revues voir 5, 6 et 7).

La structure de ce dernier composé, mise en évidence biochimiquement (8) est confirmée par dégradation (9) et par synthèse (10). La S-adénosyl méthionine 3 est formée par action de la méthionine 1 sur l'adénosine triphosphate 2; cette réaction s'effectue en présence d'ions magnésium Mg^{++} avec libération d'une molécule d'acide phosphorique et d'une molécule d'acide pyrophosphorique (schéma I).

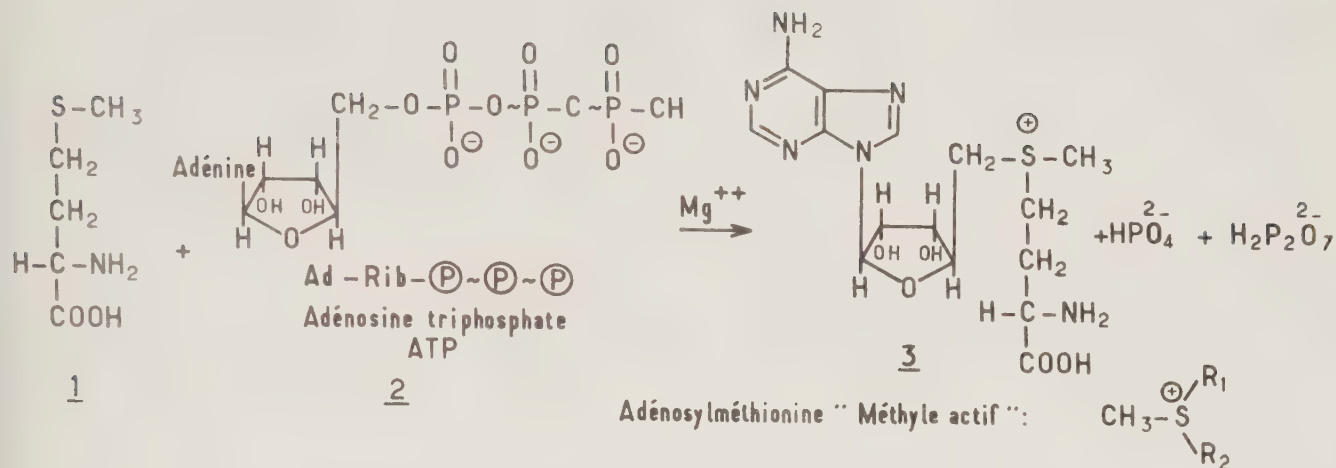


Schéma I

Dans le cas des réactions de C-méthylations biologiques, le transfert du groupe CH_3 a lieu à partir de la S-adénosyl méthionine, sur des atomes de carbone de double liaisons.

Lorsque la double liaison carbone-carbone est activée par la présence d'atomes riches en électrons, oxygène ou azote (méthylation des énolates et des phénols par exemple), le groupe méthyle* de la méthionine est introduit en entier, c'est à dire en conservant ses trois atomes d'hydrogène (schéma II).

* Dans toutes les formules, les atomes de carbone marqués d'un astérique dérivent de la méthionine.

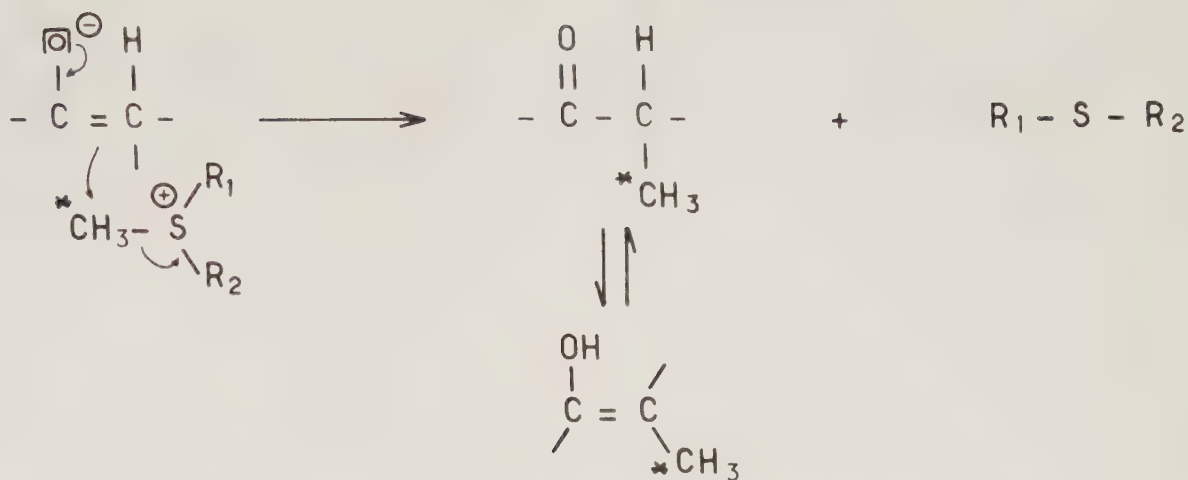
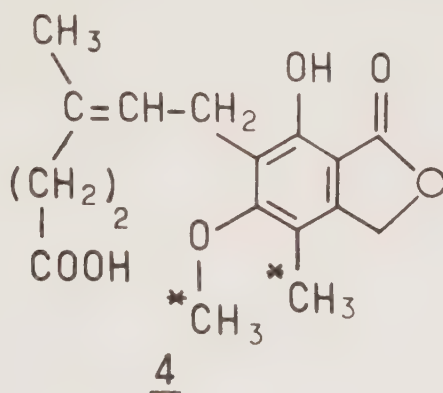
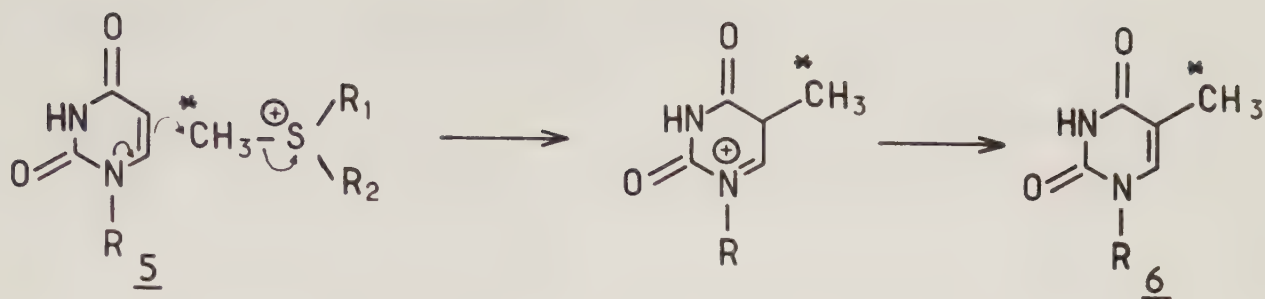


Schéma II

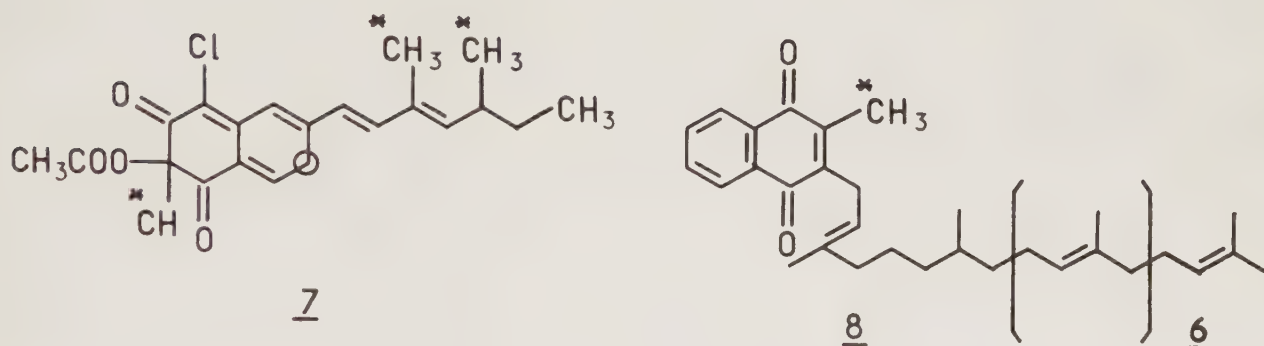
Ceci a été prouvé par incorporation de méthionine méthyl- C^2H_3 dans le cas de la biosynthèse de l'acide mycophénolique 4 (11),



ainsi que dans le cas de la biosynthèse du riboside de la thymine 6, formé par méthylation de l'uridine 5 (12), et de la biosynthèse de la



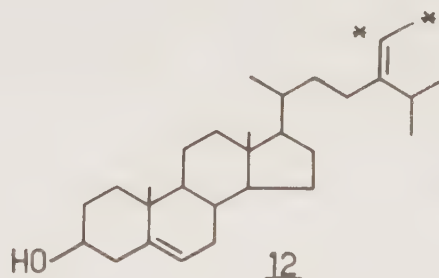
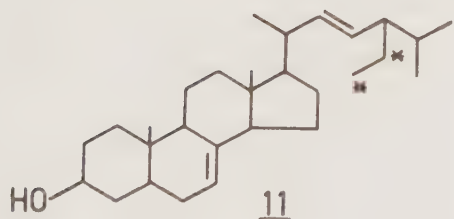
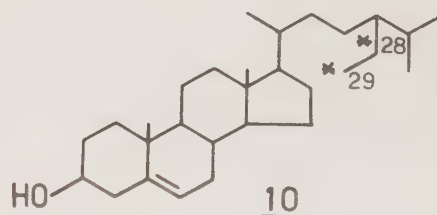
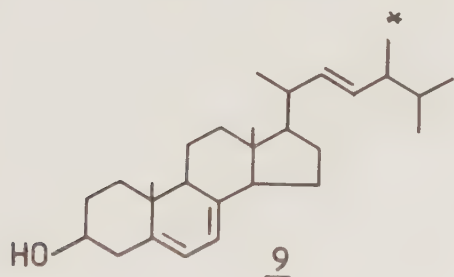
sclérotiorine 7 (13) et de la dihydroménaquinone-9 8 (13).



Par ailleurs, les C-méthylations biologiques peuvent affecter des atomes de carbone de double liaisons isolées dans des systèmes aliphatiques et conduire à des composés méthyles ou méthyléniques ramifiés. Ce type de réactions intervient en particulier dans la formation des ramifications à un ou deux atomes de carbone présentes en C-24 dans un certain nombre de phytostérols. C'est par incorporation de

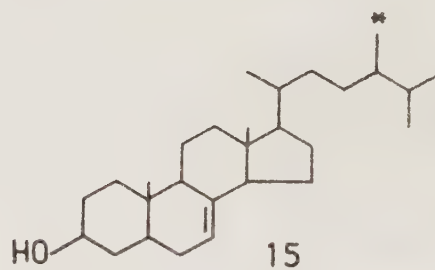
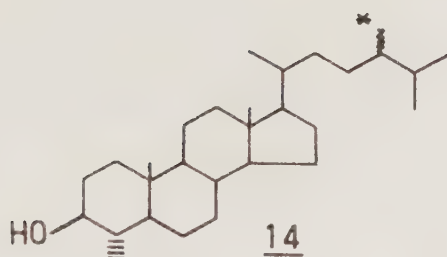
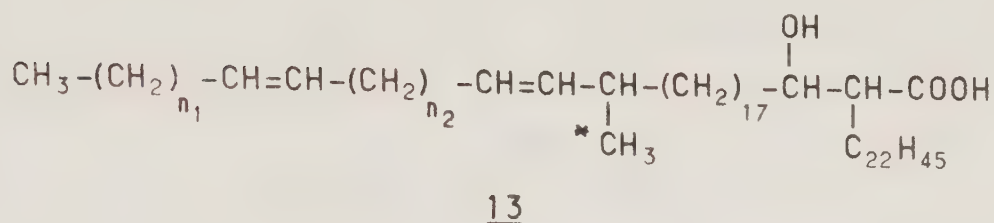
méthionine $^{14}\text{CH}_3$ dans différents organismes que l'origine des carbones 28 et 29 des stérols a été déterminée. Ainsi après incubation de Saccharomyces cerevisiae en présence de cet acide aminé marqué, Alexander et coll. (3) ont montré que la radioactivité incorporée est localisée dans le carbone 28 de l'ergostérol 9.

Par ailleurs, Nes et coll. (14) dans le cas du β -sitostérol 10 de Pisum sativum; Arigoni et coll. (15) dans le cas du spinastérol 11 de Menyanthes trifoliata et Lederer et coll. (16) dans le cas du fucostérol 12, biosynthétisé par l'algue brune Laminaria saccharina, ont montré que les carbones 28 et 29 de ces trois stérols proviennent d'une double méthylation par la méthionine.



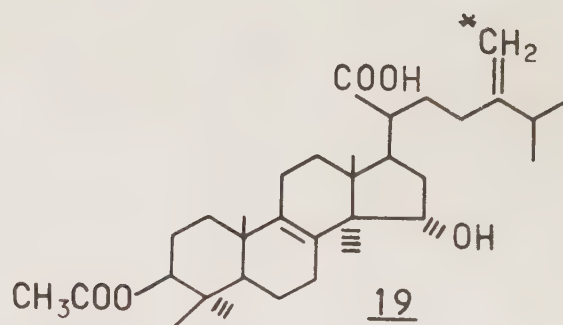
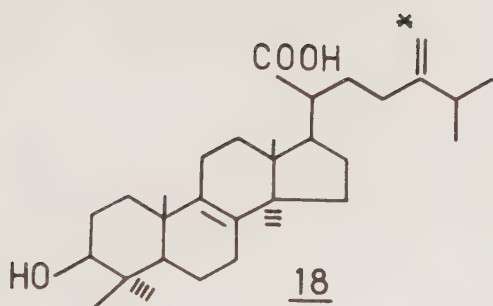
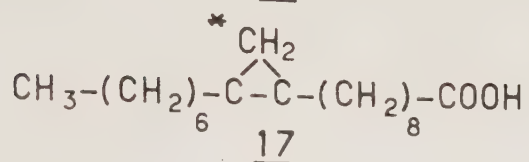
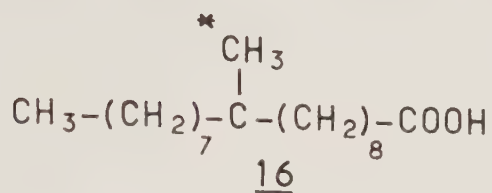
Plusieurs mécanismes de simple méthylation de double liaisons aliphatiques ont été mis en évidence par incorporation de méthionine méthyl- ^{14}C H_3 .

Ainsi, dans le cas de la biosynthèse des acides α -smegmamycoliques 13 (13) de Mycobacterium smegmatis, du méthyl-4 α , méthyl-24 cholestano-14 (17) stérol de Dictyostelium discoideum et de l'ergosten-7, ol-3 β 15(18) de Chlorella vulgaris, le groupe méthyle de la méthionine est transféré en entier et conduit à des composés trideutériés contenant le groupe C^2H_3 .



Par contre, dans le cas de la biosynthèse de l'acide tuberculostéarique (acide méthyl-10 stéarique) 16 (5, 19) de M. smegmatis et de l'ergostérol de différentes origines: Neurospora crassa (5, 19), de Gliocladium roseum (20) et d'Ochromonas danica (21), seul le transfert de deux atomes d'hydrogène est observé, conduisant à des composés méthylés dideutériés.

La méthylation par la méthionine conduit aussi à des composés cyclopropaniques tels que l'acide lactobacillique 17 (22) et méthyléniques tels que l'acide éburicoïque 18 (23) et l'acide pachymique 19 (24).



Le schéma III rend compte de ces différents mécanismes.

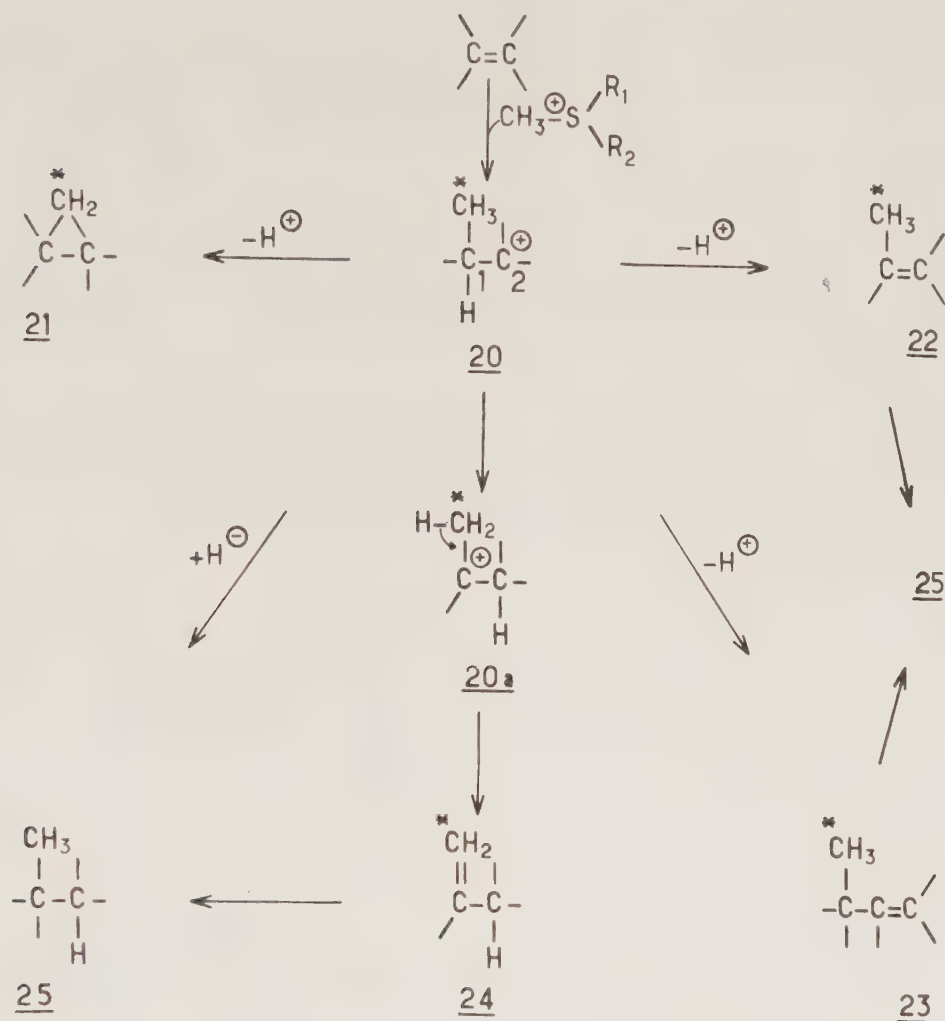
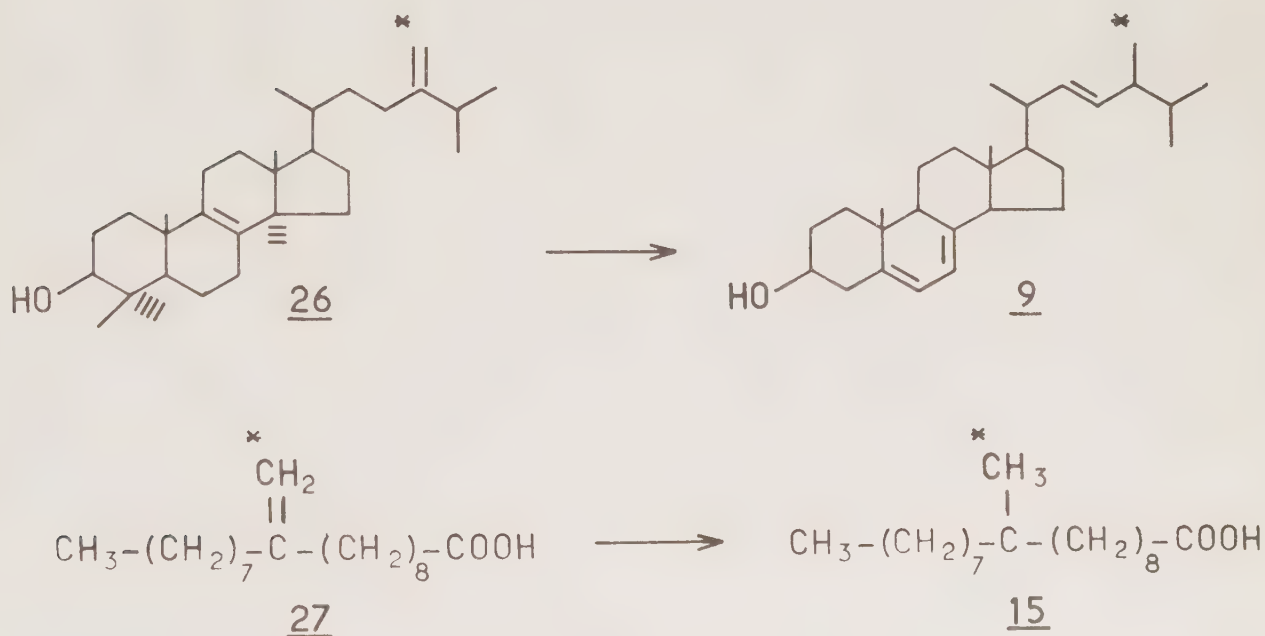


Schéma III

L'attaque de la S-adénosyl méthionine 3 par les électrons π de la double liaison du précurseur insaturé, conduit à la formation du carbocation 20. Celui-ci peut être stabilisé par fixation d'un ion hydruure (voie 20 $\rightarrow$ 25) ou par élimination d'un proton (voies 20 $\rightarrow$ 22 ou 20 $\rightarrow$ 23), ce qui conduit à des composés possédant le groupe C^2H_3 ; c'est le cas, par exemple, des composés 13, 14 et 15. Par contre,

une stabilisation selon les voies 20, 20a, 24 et 25, qui implique la migration de l'atome d'hydrogène du carbone C_1 au carbone C_2 , conduit à des composés méthyléniques 24 et méthyles ramifiés 25 où seuls deux atomes d'hydrogène de la méthionine sont conservés.

La preuve de ce mécanisme a été apportée par les travaux de Barton et coll. (25) et Akhtar et coll. (26), qui ont montré que la transformation du méthylène-24 lanostérol 26 en ergostérol 9 est possible in vivo. De même, l'acide méthylène-10 stéarique 27 a été isolé à la suite d'incubations in vitro en présence de méthionine $^{14}CH_3$ avec des extraits acellulaires de M. phlei et a pu être transformé in vivo en acide tuberculostéarique 16 par Lederer et coll. (27).



La migration d'un atome d'hydrogène du carbone C_1 sur le carbone C_2 postulée par Nes et coll.(14) a été mise en évidence par Akhtar et coll. (28), Nes et coll. (29) et Goad et Goodwin (30) qui ont montré que l'atome de tritium initialement sur le carbone 24 du précurseur stérolique migre sur le carbone 25 (schéma IV). Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par Lederer et coll.(31) dans le cas de la biosynthèse de l'acide tuberculostéarique 16 de M.phlei à partir de l'acide dideutério-oléfique 28.

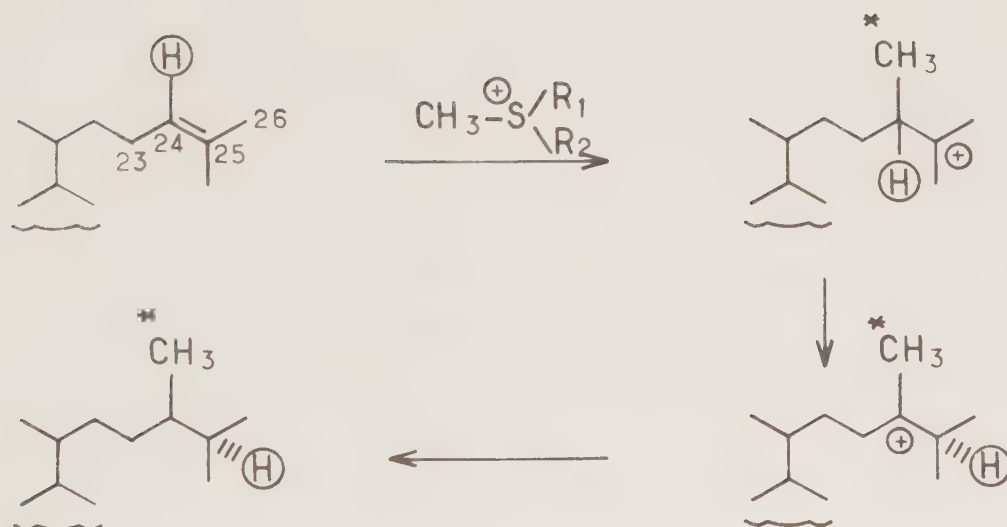


Schéma IV.



Récemment les études de Akamatsu et Law (32) ont montré que, dans ce dernier cas, la méthylation de l'acide oléique a lieu sur le phospholipide correspondant, la réduction de l'intermédiaire méthylénique nécessitant la présence de NADPH.

Dans le cas de doubles méthylations qui conduisent à des composés éthyles et éthylidènes ramifiés, on admet généralement (4, 14, 33, 34) (schéma V) que l'intermédiaire méthylénique 30, formé au cours de la première méthylation, peut servir de substrat à une deuxième méthylation pour donner le carbocation intermédiaire 31. Celui-ci, après stabilisation, conduit à des composés portant deux atomes de carbone dérivant du groupe méthyle de la méthionine.

La stabilisation du carbocation 31 peut être envisagée de deux façons différentes:

1- par fixation d'un ion hydrure (voie f) *

2- par élimination d'un des protons de la chaîne latérale pouvant conduire à l'un des différents intermédiaires 32, 33, 34, 36 et 37 selon les voies:

a: l'élimination d'un proton porté par le carbone 28 conduit à un composé 24, 28 insaturé 32

b: l'élimination d'un proton porté par le carbone 25 conduit à un composé 24, 25 insaturé 33

c: l'élimination d'un proton porté par le carbone 26 conduit à un composé 25, 26 insaturé 34

d: l'élimination d'un proton porté par le carbone 23 conduit à un composé 23, 24 insaturé 36

e: l'élimination d'un proton porté par le carbone 22 conduit à un composé 22, 23 insaturé 37.

* Dans ces différentes hypothèses, on admet que les deux composés saturé 35 et insaturé 37 ont une voie de biosynthèse commune et peuvent dériver l'un de l'autre par l'introduction ou la réduction de la double liaison C-22, C-23.

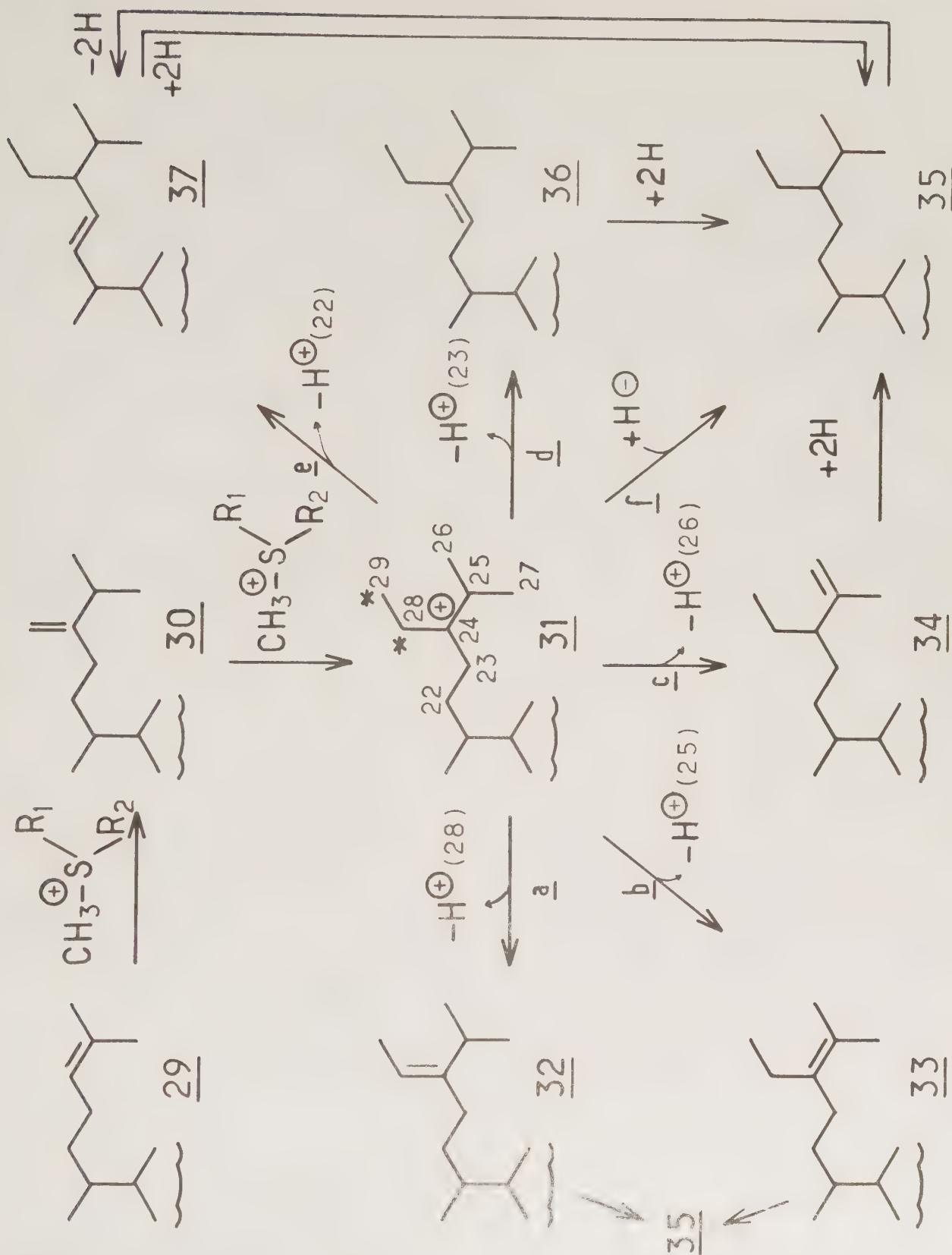


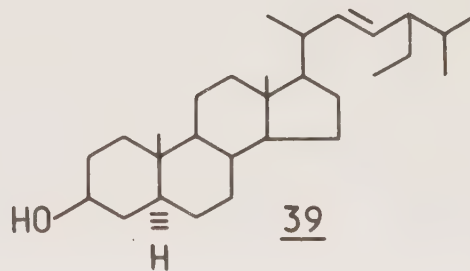
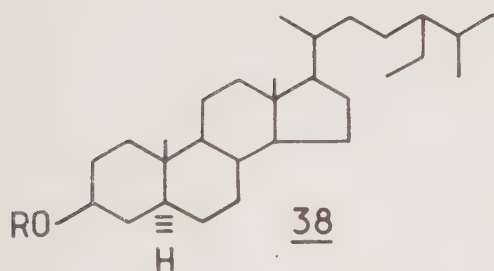
Schéma V.

L'examen de ce schéma nous montre:

1) que la voie a, qui implique le passage par l'intermédiaire 32, diffère essentiellement de toutes les autres puis qu'elle conduit à un composé dont la ramification éthyle ne contient que quatre et non cinq atomes d'hydrogène provenant de la méthionine.,

2) que les voies c et e impliquent une migration d'un atome d'hydrogène soit du carbone 25 sur le carbone 24 (voie c) soit du carbone 23 sur le carbone 24 (voie e).

Dans le présent travail nous nous sommes proposés d'étudier le mécanisme de formation de la chaîne latérale de deux stérols du myxomycète Dictyostelium discoideum ^{*}: le stigmastanol 38a et le stigmasten-22, ol-3 β 39a et de déterminer la voie de biosynthèse de ces composés.



a R=H
b R=Ac

^{*} Nous remercions M.le Professeur D.Arigoni qui nous a conseillé l'étude de Dictyostelium discoideum

Nous exposerons successivement:

- l'étude de l'incorporation du groupe méthyle de la méthionine $\text{Me-C}^2\text{H}_3$, chapitre I
- l'étude de l'incorporation du lanostérol 24- ^3H , 26-27 ^{14}C , chapitre II
- l'étude de l'incorporation du lanostérol 23- ^3H , 26-27 ^{14}C , chapitre III
- l'étude de la transformation stigmastanol-stigmasten-22, ol-3 β , chapitre IV.

CHAPITRE I

ETUDE DE L'INCORPORATION DU GROUPE METHYLE DE LA
METHIONE ME-C²H₃ DANS LES STEROLS DU MYXOMYCETE
DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM.

CHAPITRE I .

Nous avons vu dans l'introduction qu'une voie de biosynthèse des stérols 38a et 39a (voie a schéma V)* implique le départ d'un hydrogène originaire de la méthionine et porté par le carbone 28.

L'étude de ce problème peut être envisagée par deux méthodes différentes:

- soit par incorporation d'un mélange de méthionine $\text{Me-C}^3\text{H}_3$ et de $\text{Me-}^{14}\text{CH}_3$
- soit par incorporation de méthionine $\text{Me-C}^2\text{H}_3$

Dans la première méthode, l'interprétation des résultats peut être rendue délicate par l'effet isotopique important qui peut accompagner les ruptures des liaisons C-H et C^3H si cette coupure est l'étape déterminant la vitesse de la réaction (35). Par contre, dans la deuxième méthode, l'examen par spectrométrie de masse des stérols biosynthétisés, nous permet de compter d'une façon précise le nombre d'atomes de deutérium incorporés dans la molécule, et même, de déterminer éventuellement leur position.

Pour élucider ce problème, nous avons choisi d'étudier l'incorporation de méthionine tri-deutériée dans les stérols de Dictyostelium discoideum.

La méthionine marquée est obtenue par action de l'iodure de méthyle

* voir page 12

deutérié sur l'homocystine, en présence d'amidure de sodium (36). Le spectre de masse de l'ester éthylique de cette méthionine, indique la présence de trois atomes de deutérium dans la molécule avec une pureté isotopique supérieure à 99%.

Les cultures de Dictyostelium discoideum ont été effectuées en présence de E.coli qui servent de nourriture au myxomycète. Afin d'obtenir une bonne incorporation de méthionine marquée, nous avons employé une souche d'E.coli méthionine-less,^{*} cultivée en présence de méthionine deutériée et effectué la pousse du myxomycète sur ces cultures marquées.

La chromatographie sur colonne d'acide silicique de l'insaponifiable obtenu à partir des cellules de Dictyostelium discoideum permet d'isoler le stigmasten-22, ol-3 β 39a (80%), accompagné d'un stérol (environ 20%) non signalé par Hefmann et coll.(37, 38). La comparaison des spectres de masse et le comportement en chromatographie en phase gazeuse, sur colonne de silicone SE-30 et SE-52 de leurs dérivés triméthylsililés, nous ont permis d'identifier le dernier composé au stigmastanol 38a^{**}.

Etude des spectres de masse des acétates de stigmastanol 38a et de stigmasten-22, ol-3 β 39b.

Le spectre de masse (Fig 1a) d'un échantillon du composé 39b contenant encore une faible proportion de stérol saturé, présente les pics caractéristiques suivants:

* Nous remercions le Dr.M.I.Kinchersky de nous avoir suggéré l'utilisation d'une souche d'E.coli méthionine-less.

** Il faut noter qu'il ne nous a pas été possible d'obtenir une séparation complète de ces deux composés ni par chromatographie sur couche mince d'acide silicique imprégné de nitrate d'argent, ni par cristallisation fractionnée des stérols 38a et 39a ou de leurs acétates.

- le pic moléculaire à m/e 456
- un pic à m/e 427 (M-29) dû à la perte du groupement éthyle de la chaîne latérale,
- un pic à m/e 413 (M-43) dû à la perte du groupement isopropyle de la chaîne latérale,
- un pic à m/e 344 (M-122) dû à la perte d'une partie de la chaîne latérale (carbones 22 à 29)
- un pic de base à m/e 257 (M- 60+139) correspondant à la perte d'une molécule d'acide acétique et de la chaîne latérale complète (voir tableau I).

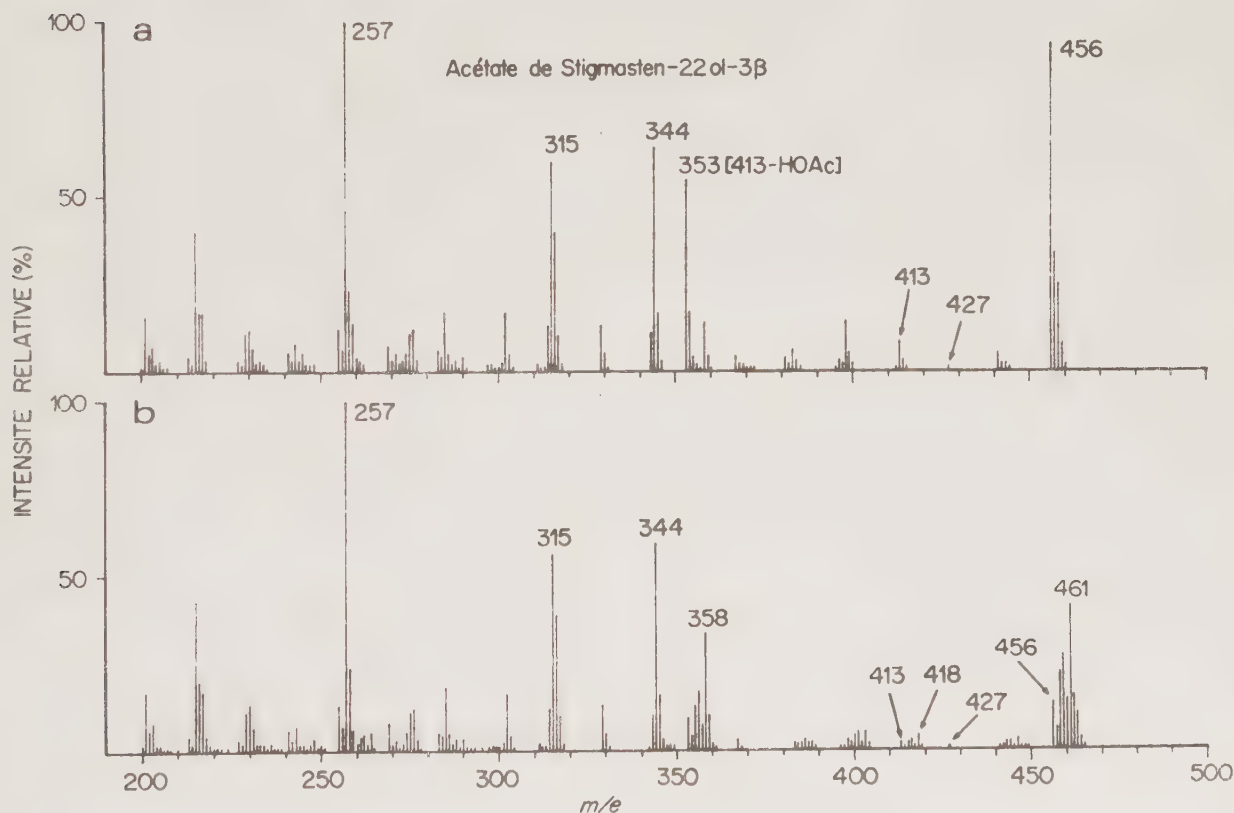


Fig.1 - Spectre de masse des acétates de stigmasten-22 ol 3β 39b
non marqué (Fig.1a) et deutéré (Fig.1b)

Dans le spectre du composé 39b^{*} (Fig. Ib) provenant de culture deutériées le pic le plus important dans la région du pic moléculaire est à m/e 461 ($456 + 5$), ce qui indique la présence de cinq atomes de deutérium dans la molécule. Les pics à m/e 458 ($456 + 2$) et 459 ($456 + 3$) qui l'accompagnent, sont dûs à la présence de molécules formées par méthylations mixtes par une molécule de méthionine méthyl C^2H_3 et par une molécule méthyl- CH_3 ; une double méthylation par la méthionine méthyl- CH_3 conduit à des molécules non marquées dont la présence est indiquée par le pic moléculaire à m/e 456.

Le pic à m/e 344 (M-112) reste inchangé et indique la présence des cinq atomes de deutérium dans la chaîne latérale. Alors que le pic à m/e 413 est accompagné du pic isotopique à m/e 418 ($413 + 5$) ce qui indique l'absence des atomes de deutérium dans le fragment isopropyle (carbone 25, 26, 27), le pic à m/e 427 dû au départ du groupe éthyle (C-28 et C-29) reste inchangé; ceci est donc en faveur d'une localisation des cinq atomes de deutérium dans le fragment éthyle.

^{*}

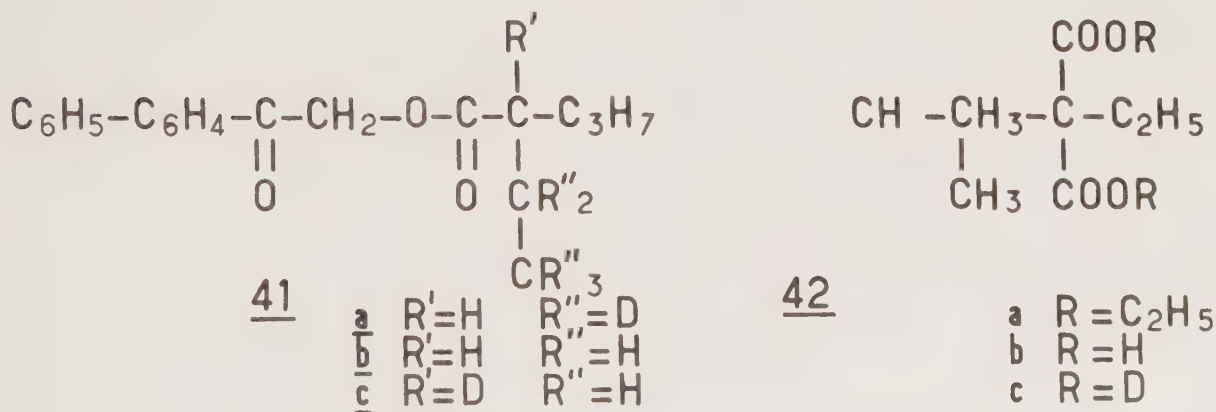
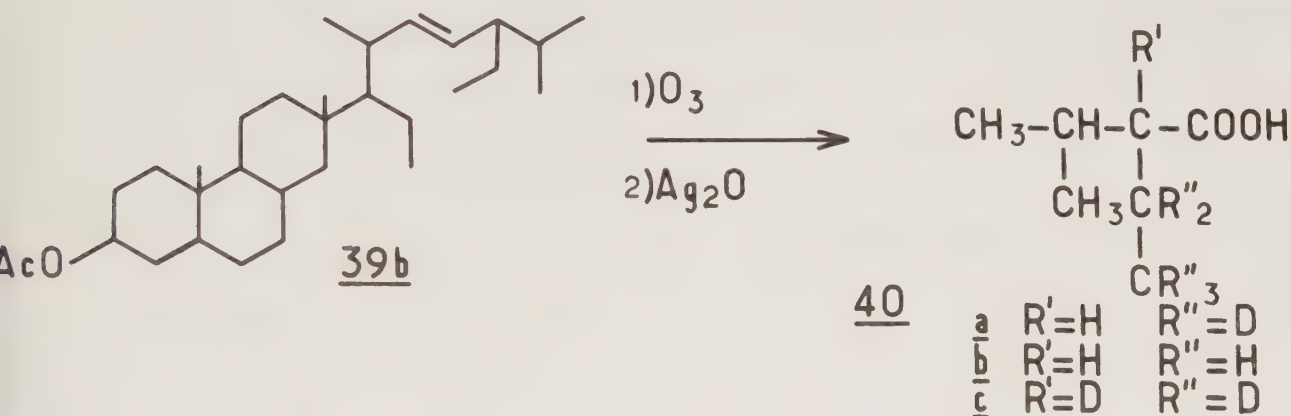
Le spectre de masse du dérivé T.M.S. du composé 38a montre que le stigmastanol incorpore également cinq atomes d'hydrogène de la méthionine.

TABLEAU I.

Fragmentation des spectres de masse du composé 39b non deutérié et deutérié.

Fragmentations	Pics observés (m/e)	
	Composé non deutérié	Composé deutérié
M ⁺	556	456 - 458 - 459 - 461
M-29(ramification C-24 éthyle)	427	427
M-43(isopropyle terminal)	413	413 - 415 - 416 - 418
M-(60 + 43)	353	353 - 355 - 356 - 358
M-112 (perte des carbones 22 à 29)	344	344
M-(chaîne latérale + 2)	315	315
M-(chaîne latérale + 60)	257	257

Afin de confirmer ce résultat, nous avons soumis le stérol 39b à une dégradation par ozonolyse. Après oxydation par l'oxyde d'argent de l'ozonide, l'acide éthyl-2 méthyl-3 butyrique 40a formé est alors isolé sous forme de son ester p-phényl phénacylique 41a. Ce composé a été comparé par spectrométrie de masse aux esters correspondants de l'acide non marqué 40b $R' = R'' = H$ et de l'acide éthyl-2 deutério-2 méthyl-3 butyrique 40c^{*} $R' = D, R'' = H$.

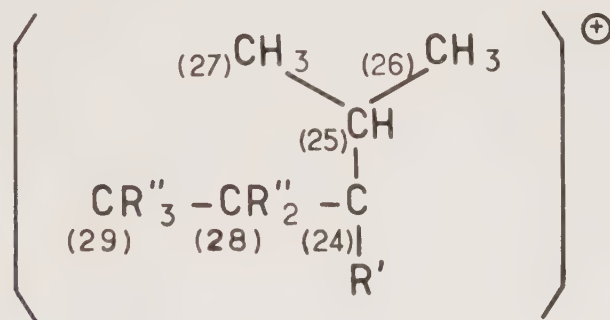


* Ce composé a été obtenu à partir de l'éthyl-2 isopropyl-2 malonate d'éthyle 42a synthétisé selon la méthode décrite par Kopp et Tchoubar (39); par saponification nous avons obtenu le diacide 42b. Après échange des hydrogènes mobiles de ce diacide par traitement à l'eau lourde (40) suivi d'une décarboxylation thermique, nous avons isolé l'acide 40c dont nous avons préparé l'ester p-phényl phénacylique 41c.

Etude des spectres de masse des esters 42a, 42b et 42c

Le spectre de masse (Fig.IIb) du composé 41b présente un pic moléculaire à m/e 324. Alors que ce pic est déplacé à m/e 325 (Fig.IIc) dans le spectre de l'ester 41c, dans le spectre du composé 41a (Fig.IIa) quatre pics apparaissent à m/e 329 (324 + 5), 327 (324 + 2) et 324 (M^+) correspondant à des composés pentadeutériés (35%), trideutériés (20%), dideutériés (21%) et non deutériés (16%) (voir tableau II). Les pics à m/e 328 et 325, respectivement ($M + 4$) et ($M + 1$) sont de très faible importance ($< 1\%$ pour le premier et $< 2\%$ pour le deuxième) et peuvent être attribués à la présence de composés tétra et monodeutériés, formés soit à partir des produits penta et dideutérié par échange d'hydrogène au cours de la biosynthèse, soit par participation mineure de la voie d (schéma V; p. 11) lors de la biosynthèse des composés 38a et 39a. (voir tableau II).

Le pic de fragmentation à m/e 85, correspondant dans le spectre du composé 41b à l'ion



est déplacé à m/e 86 dans le spectre du composé 41c. Il est accompagné des pics à m/e 90, 88, et 87 dans le spectre du composé 41a.

Les pics à m/e 55, 57 et 69* dans le spectre du produit 41b sont déplacés à m/e 56 ($55 + 1$), 58 ($57 + 1$) et 70 ($69 + 1$) dans le spectre du produit monodeutéié 41c où $R' = D$, ils doivent donc être attribués à des fragments contenant l'atome d'hydrogène " R' ". Le spectre du composé pentadeutéié 41a, pour ces pics, est comparable à celui du composé non marqué 41b. Ceci prouve donc que ces fragments ne contiennent pas d'atomes de deuterium et que pour le composé 41a l'atome $R' = H$.

Les cinq atomes de deuterium se trouvent donc localisés sur les deux carbones 28 et 29 dérivés de la méthionine ($R'' = D$).

* Les pics de fragmentation à m/e 55, 57 et 69 ne peuvent être attribués à une fragmentation simple, ils correspondent à des fragments C_3H_3O ou C_4H_7 ; C_3H_5O ou C_4H_9 et C_4H_5O ou C_5H_9 .

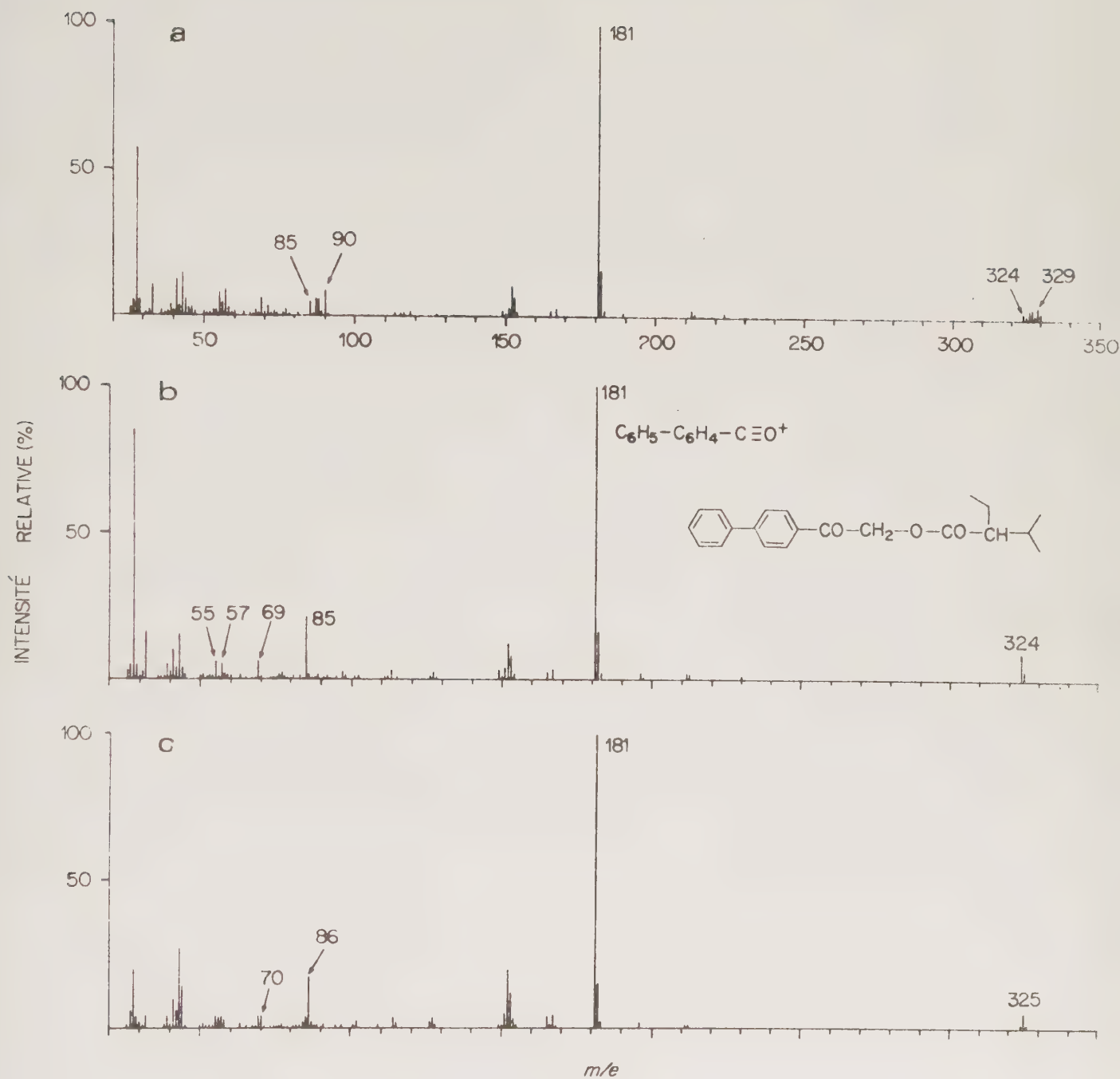


Fig.II Spectres de masse des esters 41a (Fig.IIa), 41b (Fig. IIb) et 41c (Fig.IIc).

TABLEAU II.

Fragmentation des spectres de masse des composés
4la, 4lb et 4lc.

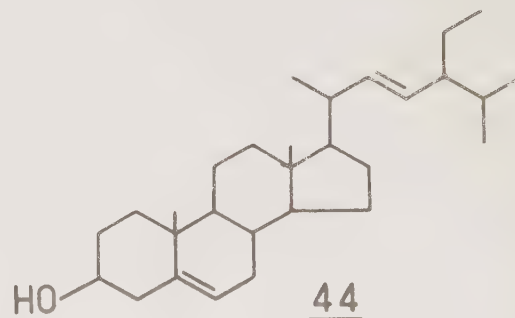
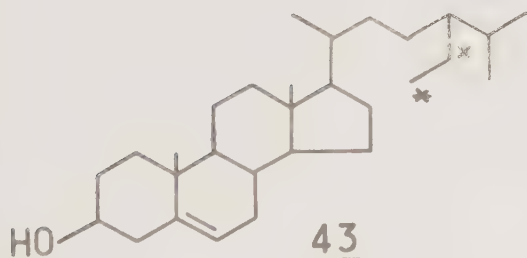
Fragmentations	Pics observés (m/e)						
	Composé pentadeutérié				Composé non deutérié	Composé monodeutérié	
M^+	324	326	327	329	324	325	
$M^+ - 143$	181				181	181	
$M^+ - 239$	85	87	88	90	85	86	
$M^+ - 255$	69				69	70	
$M^+ - 267$	57				57	58	
$M^+ - 269$	55				55	56	

CONCLUSION :

Les résultats obtenus montrent que les cinq atomes d'hydrogène provenant de la méthionine se trouvent bien localisés dans le fragment éthyle de la chaîne latérale du stigmasten-22, ol-3 β 39a.

La voie de biosynthèse a impliquant le passage par un intermédiaire éthylidène du type 32 qui a pu être prouvée dans le cas de la biosynthèse du β -sistostérol 43 de pois (41, 42), ainsi que dans le cas du poriférostérol 44 de Ochromonas malhamensis (33) n'intervient donc pas dans le cas de la biosynthèse des stérols de Dictyostelium discoideum.

Récemment une incorporation comparable de cinq atomes de deutérium a été obtenue dans les ramifications éthyle des différents stérols du myxomycète Physarum polycephalum (43) .



Ces résultats ne nous permettent cependant pas de choisir entre les autres possibilités (b, c, d, e et f).

CHAPITRE II

ETUDE DE L'INCORPORATION DU LANOSTEROL 24 ^3H ;
26, 27 ^{14}C DANS LES STEROLS DE DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM.

CHAPITRE II.

Les résultats présentés au Chapitre I permettent d'exclure la voie de biosynthèse a du schéma général V * pour les stérols 38a et 39a donc le passage par un intermédiaire du type fucostérol lors de la biosynthèse de ces deux stérols. Nous nous sommes alors proposés d'étudier les autres voies possibles et plus particulièrement les voies b et c.

La formation des deux intermédiaires hypothétiques 33 et 34 fait intervenir l'atome d'hydrogène porté par le carbone 24 du précurseur 29 (schéma V). Nous avons vu que cet atome d'hydrogène migre de la position C-24 en C-25 lors de la formation de l'intermédiaire 24-méthylénique 30 (18, 29, 30). A partir du carbocation 31, cet atome peut évoluer de deux manières différentes:

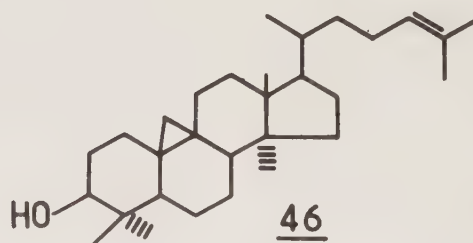
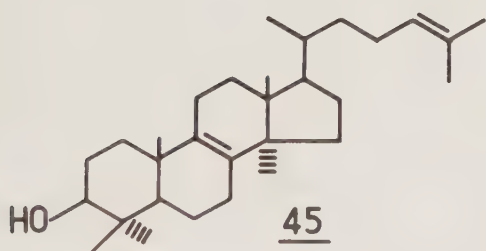
- la voie b implique son élimination
- la voie c entraîne sa migration du carbone 25 sur le carbone 24.

Les faibles taux d'incorporation du précurseur dans les stérols étudiés ne nous permettant pas d'envisager l'emploi de molécules marquées au deutérium, nous avons choisi, de mettre en évidence la perte éventuelle de l'hydrogène en 24 au cours des transformations biochimiques, en comparant les rapports $^3\text{H}^{14}\text{C}$ dans les différents composés 38a, 39a, 45. Nous avons donc synthétisé le lanostérol 24- ^3H 45a.

Nous devons remarquer que le choix du lanostérol comme

* voir p.12

précurseur des stérols 38a et 39a peut sembler arbitraire^{*}. Cependant ce choix se justifie. En effet, la présence du lanostérol a pu être mise en évidence dans la fraction triterpénique d'un organisme voisin le myxomycète Physarum polycephalum (43). D'autre part, il a été démontré qu'il existe une interconversion in vivo entre le lanostérol 45 et le cycloarténol 46, les deux précurseurs possibles des stérols 38a et 39a. Ces deux triterpènes ont pu être indifféremment incorporés dans les tissus de tabac (44), dans les tissus de petits pois (45) et dans le phytoflagellé Ochromonas malhemensis (46).

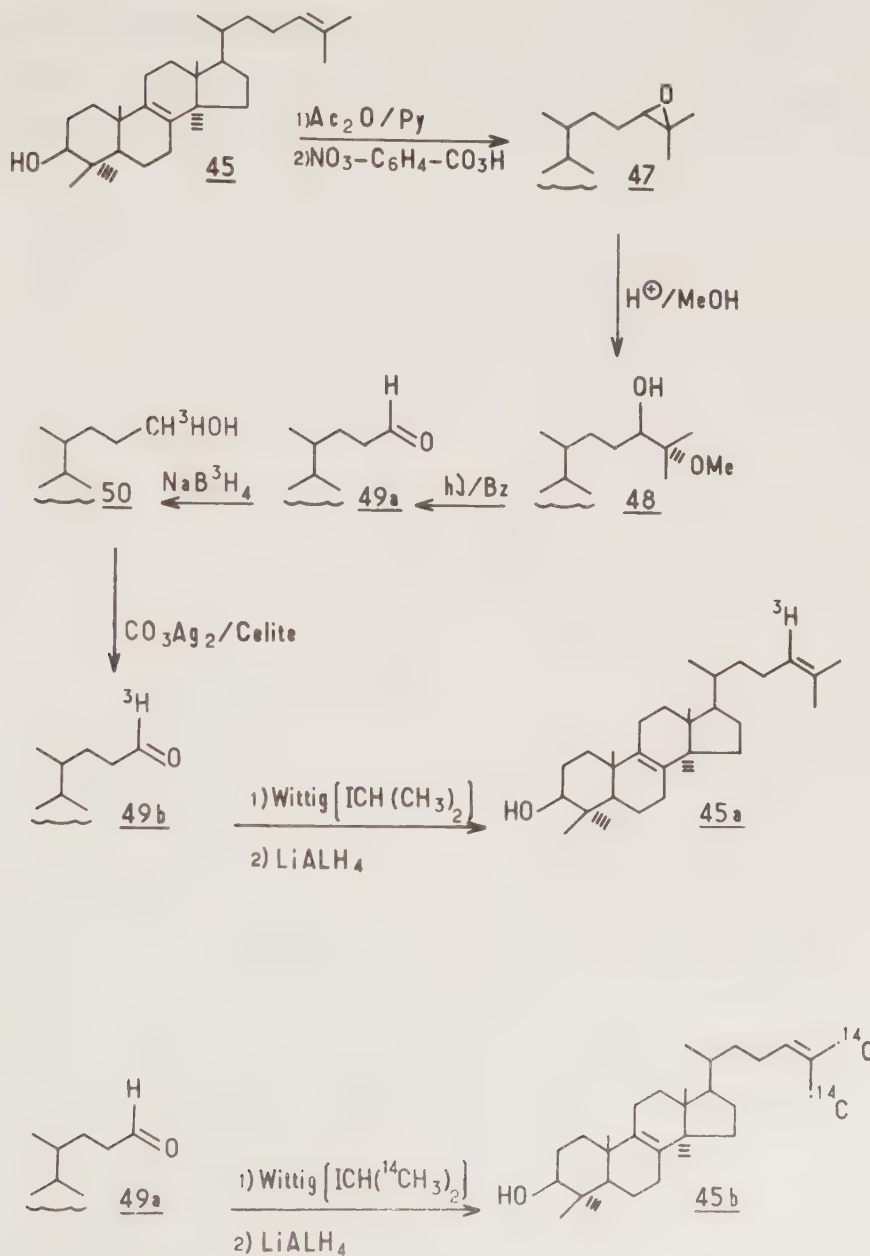


Le lanostérol 24-³H a été préparé selon la méthode décrite par Akhtar et coll. (28). Le lanostérol a été acétylé et époxydé en position 24-25; l'ouverture de cet époxyde 47 en milieu acide dans le méthanol, conduit au composé 48. L'aldéhyde 49a a été obtenu par irradiation du dérivé stérolique 48. Cet aldéhyde a été alors réduit en alcool 50 par le borohydrure de sodium tritié. L'oxydation de cet alcool par le carbonate d'argent (47) conduit à l'aldéhyde 49b. L'acétate de lanostérol 24-³H a

* La présence en quantité trop faible des triterpènes dans la souche étudiée n'a pas pu nous permettre d'en déterminer la nature.

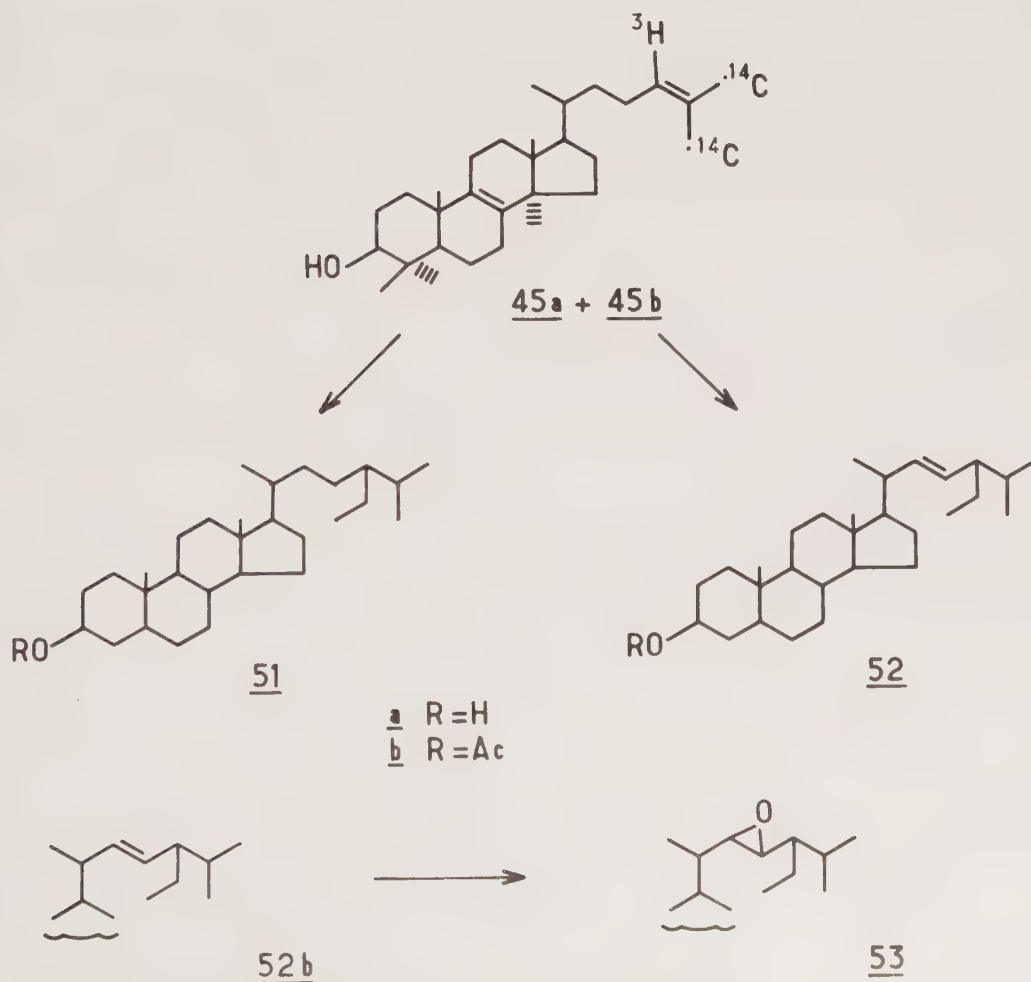
été obtenu par condensation de l'iodure d'isopropyle sur l'aldéhyde 49b. L'hydrolyse de cet acétate donne le lanostérol 24- ^3H 45a (activité spécifique $3,4 \cdot 10^8$ dpm/mmmole).

Nous avons synthétisé d'autre part, le lanostérol 26,27- ^{14}C 45b par condensation de l'iodure d'isopropyle 1-3 ^{14}C sur l'aldéhyde 49a, suivie de l'hydrolyse de l'acétate (activité spécifique $5,03 \cdot 10^8$ dpm/mmmole).



Les cellules entières de Dictyostelium discoideum ont été incubées en présence d'un mélange de lanostérol 24-³H 45a et de lanostérol 26-27 ¹⁴C 45b (³H ¹⁴C, 5,6 ± 0,25; radioactivité du lanostérol en ¹⁴C: 2,5 10⁶ dpm).

Les cellules récoltées ont été saponifiées et la fraction correspondante aux phytostérols, isolée par chromatographie sur colonne d'acide silicique (³H/¹⁴C 5,55 ± 0,26, 2,2% d'incorporation calculée par rapport à la radioactivité en ¹⁴C de lanostérol introduit). Cette fraction a été acétylée et époxydée. Les acétates de stigmastanol 51b et d'époxy-22,23 stigmastanol 53 séparés sur une plaque d'acide silicique ont été cristallisés à radioactivité constante.



Les résultats obtenus (Tableau III) montrent que le lanostérol introduit a un rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ ($5,6 \pm 0,15$) comparable à celui de l'acétate de stigmastanol 51b $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ ($5,54 \pm 0,28$) ainsi qu'à celui de l'acétate de l'époxy-22, 23 stigmastanol 53 $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ ($5,61 \pm 0,23$).

TABLEAU III

Composés	Rapports $^3\text{H}/^{14}\text{C}$				Radioactivité en ^{14}C dpm/mmole
	Avant cristallisation	1 ^{ère} cristallisation	2 ^{ème} cristallisation	3 ^{ème} cristallisation	
Lanostérol	$5,57 \pm 0,16$	$5,60 \pm 0,15$			$5,03.10^{11}$
Acétate de Stigmastanol <u>51b</u>	$5,50 \pm 0,25$	$5,55 \pm 0,23$	$5,54 \pm 0,26$	$5,54 \pm 0,28$	43.968
Acétate d'époxy-22, 23 stigmastanol <u>53</u>	$5,46 \pm 0,2$	$5,55 \pm 0,25$	$5,54 \pm 0,21$	$5,61 \pm 0,23$	31 568

L'examen de ces rapports indique:

1- que la biosynthèse du stigmastanol 51a et du stigmastén-22, 23 52a ne peuvent procéder par la voie b.

2- que les deux stérols 51a et 52a sont formés à partir du lanostérol sans la perte de l'atome d'hydrogène en C-24.

Cependant ces résultats ne nous permettent pas d'éliminer la voie c comme voie de biosynthèse des stérols 51a et 52a.

Afin de poursuivre cette étude nous nous sommes proposés de localiser l'atome de tritium résiduel dans le stérol 52a. Une fraction du composé 52a a été soumise à une dégradation par ozonolyse en milieu neutre (48). Après oxydation de l'ozonide par le réactif de Jones (49), l'acide éthyl-2 méthyl-3 butyrique 54 a été isolé sous forme de son ester p-phényl phénacylique 55.

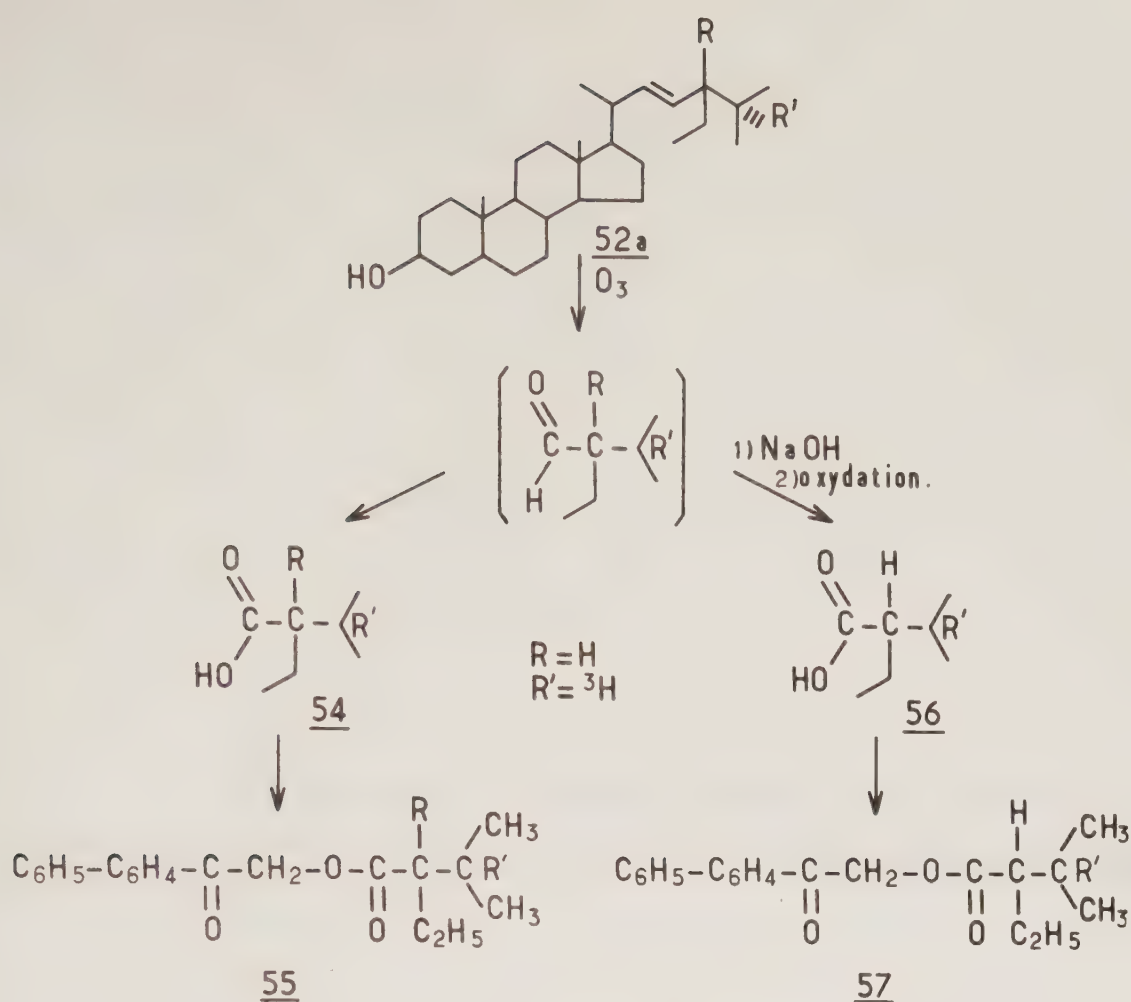
La deuxième fraction soumise à la même dégradation par ozonolyse, a été échangée en milieu basique* puis oxydée selon Jones et l'acide 56 a été isolé sous forme de son ester p-phényl phénacylique 57. Les deux esters 55 et 57 ont été recristallisés à radioactivité constante.

Les résultats obtenus montrent que les rapports de radioactivité $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ du lanostérol introduit (5, 6) de l'ester non soumis à l'échange ($5,54 \pm 0,28$) et de l'ester échangé ($5,55 \pm 0,3$) sont comparables. Ceci prouve donc que l'atome de tritium, initialement sur le carbone 24 du précurseur, a migré du carbone 24 sur le carbone 25 (28, 29, 30).

* L'éthyl-2 méthyl-3 butyraldéhyde a été traité dans les mêmes conditions en présence d'eau tritiée.

Une fraction de cette solution a été oxydée par le réactif de Jones et l'acide correspondant est isolé sous forme de son ester p-phényl phénacylique: activité spécifique 1660 dpm/mg, rendement 82,1%.

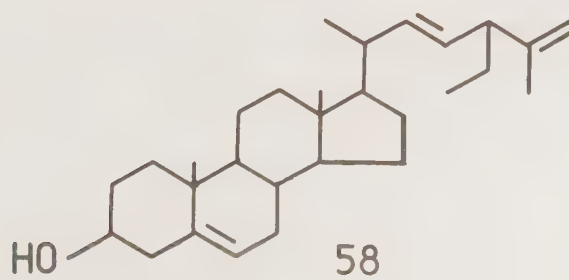
La deuxième fraction est diluée avec la même solution. Après 24 heures celle-ci est oxydée selon Jones et l'acide éthyl-2 méthyl-3 butyrique est isolé sous forme de son ester p-phényl phénacylique. Activité spécifique : 490 dpm/mg, soit une perte de 70% environ de la radioactivité.



CONCLUSIONS :

L'étude de l'incorporation du mélange de lanostérol 24- 3H et de lanostérol 26, 27 ^{14}C nous a permis de montrer que la biosynthèse des stérols 38a et 39a ne peut procéder par la voie b.

En outre la voie de biosynthèse c, impliquant la migration de l'atome d'hydrogène du carbone 25 au carbone 24, qui a pu être prouvée dans le cas de la biosynthèse du 24-éthylcholesta-5, 22, 25-trien ol-3 β 58 de Clerodendrum campbellii par Goodwin et coll.(50) n'intervient pas dans le cas de la biosynthèse du stigmastén-22, ol-3 β de Dictyostelium discoideum.

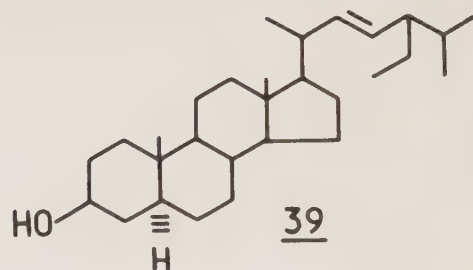
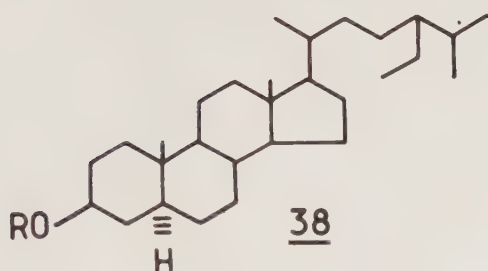


CHAPITRE III

ETUDE DE L'INCORPORATION DU LANOSTEROL
23-³H ET 26-27 ¹⁴C DANS LES STEROLS DE DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM.

CHAPITRE III

Les résultats obtenus précédemment nous ont permis d'exclure les voies a, b et c (schéma V, p. 12), comme voies de biosynthèse des stérols 38a et 39a.

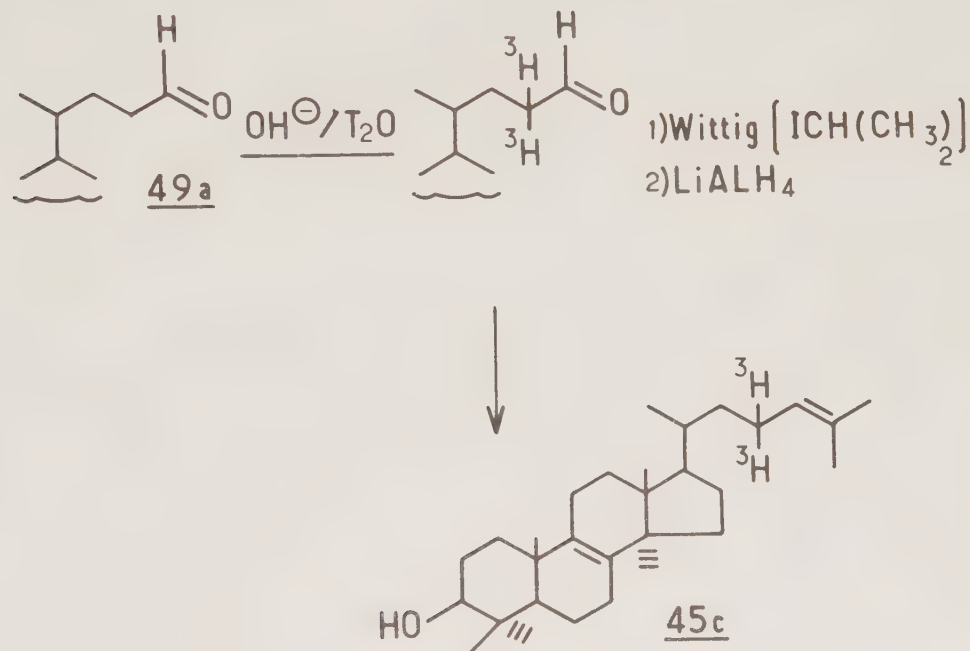


a R = H
b R = Ac

Nous avons alors étudié les deux voies d et e du schéma général V. Ces deux voies se distinguent par l'évolution des atomes d'hydrogène portés par le carbone 23 du précurseur 29. Alors que la voie d implique l'élimination d'un des atomes d'hydrogène portés par le carbone 23, la voie e les conserve tous deux, mais entraîne la migration de l'un d'eux, du carbone 23 sur le carbone 24. Ainsi, la détermination du nombre et la localisation de ces atomes d'hydrogène dans les stérols

38a et 39a, devaient nous renseigner sur le mode de formation de la double liaison C-22, C-23 présente dans le stérol 39a.

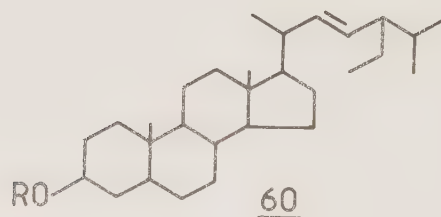
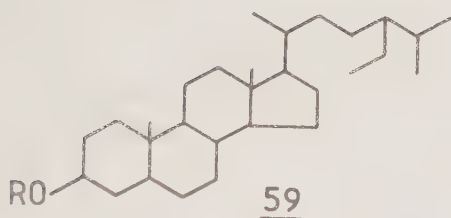
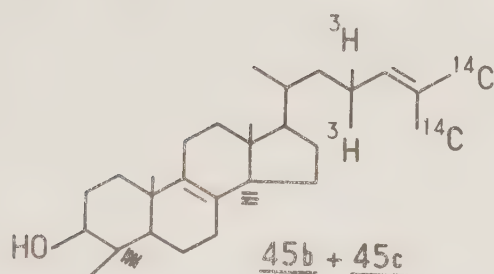
Pour résoudre ce problème nous avons préparé le lanostérol 23-³H 45c (51). A partir de l'aldéhyde 49a marqué au tritium par échange des hydrogènes mobiles en milieu basique. La condensation de l'isopropyl triphénylphosphonium sur l'aldéhyde 49c conduit à l'acétate de lanostérol 23-³H dont l'hydrolyse donne le lanostérol 23-³H 45c (activité spécifique $8,09 \cdot 10^8$ dpm/mmmole).



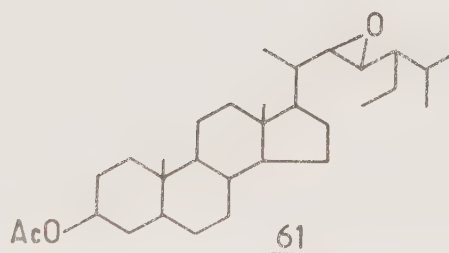
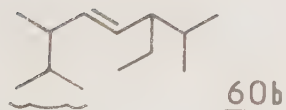
Les cellules entières de Dictyostelium discoideum ont été incubées en présence d'un mélange de lanostérol 23-³H 45c et de lanostérol 26-27-¹⁴C 45b ($^3\text{H} / ^{14}\text{C}$: $4,36 \pm 0,1$; radioactivité du lanostérol en ^{14}C : 10^6 dpm).

Les cellules récoltées ont été saponifiées et la fraction correspondant aux phytostérols, isolées par chromatographie sur colonne d'acide silicique ($^3\text{H} / ^{14}\text{C}$: 4,06; 2,4% d'incorporation calculé par rapport à la radioactivité en ^{14}C de lanostérol introduit), cette fraction a été acétylée et époxydée.

Les acétates de stigmastanol 59b et d'époxy-22, 23 stigmastanol 61 séparés sur plaque d'acide silicique ont été cristallisés à radioactivité constante.



a R = H
b R = Ac



Les résultats obtenus (Tableau V) montrent que l'acétate de stigmastanol 59b a un rapport T/ ^{14}C ($4,12 \pm 0,21$) comparable à celui du lanostérol ($4,36 \pm 0,1$) introduit et supérieur à celui de l'acétate de l'époxy-22, 23 stigmastanol 61 ($3,32 \pm 0,14$) ainsi qu'une activité spécifique supérieure à celle du composé 61.

TABLEAU V.

Composés	Rapports $^3\text{H}/^{14}\text{C}$					Radioactivité en ^{14}C dpm/mM
	Avant cristallisation	1 ^{ère} cristallisation	2 ^{ème} cristallisation	3 ^{ème} cristallisation	4 ^{ème} cristallisation	
Lanostérol	$4,36 \pm 0,1$	$4,36 \pm 0,1$				$5,03 \cdot 10^8$
Acétate de stigmastanol <u>59b</u>	$3,91 \pm 0,19$	$4,15 \pm 0,19$	$4,08 \pm 0,21$	$4,14 \pm 0,23$	$4,12 \pm 0,21$	34.043 ± 860
Acétate d'époxy-22, 23 stigmastanol <u>61</u>	$3,73 \pm 0,19$	$3,43 \pm 0,13$	$3,37 \pm 0,15$	$3,34 \pm 0,14$	$3,32 \pm 0,14$	19.859 ± 340

L'examen de ces rapports indique:

1- que les biosynthèses du stigmastanol 59a et du stigmastén-22, ol-3 β 60a ne peuvent procéder par la voie d.

2- que le composé 59b est formé à partir du lanostérol sans la perte des atomes d'hydrogène en C-23.

En outre, les valeurs des activités spécifiques des deux stérols 59a et 60a sont en accord avec une voie de biosynthèse où le composé saturé 59a serait le précurseur du composé insaturé 60a.

Cependant, ces résultats ne nous renseignent pas sur le mode de formation de la double liaison C-22, C-23 présente dans le stérol 60a. En effet, le rapport des radioactivités $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ (3, 32) obtenu pour le composé 61, dérivé de 60a, est compris entre les rapports 4, 36 correspondant à la rétention des deux atomes de tritium et 2, 18 correspondant à la perte d'un atome d'hydrogène en 23.

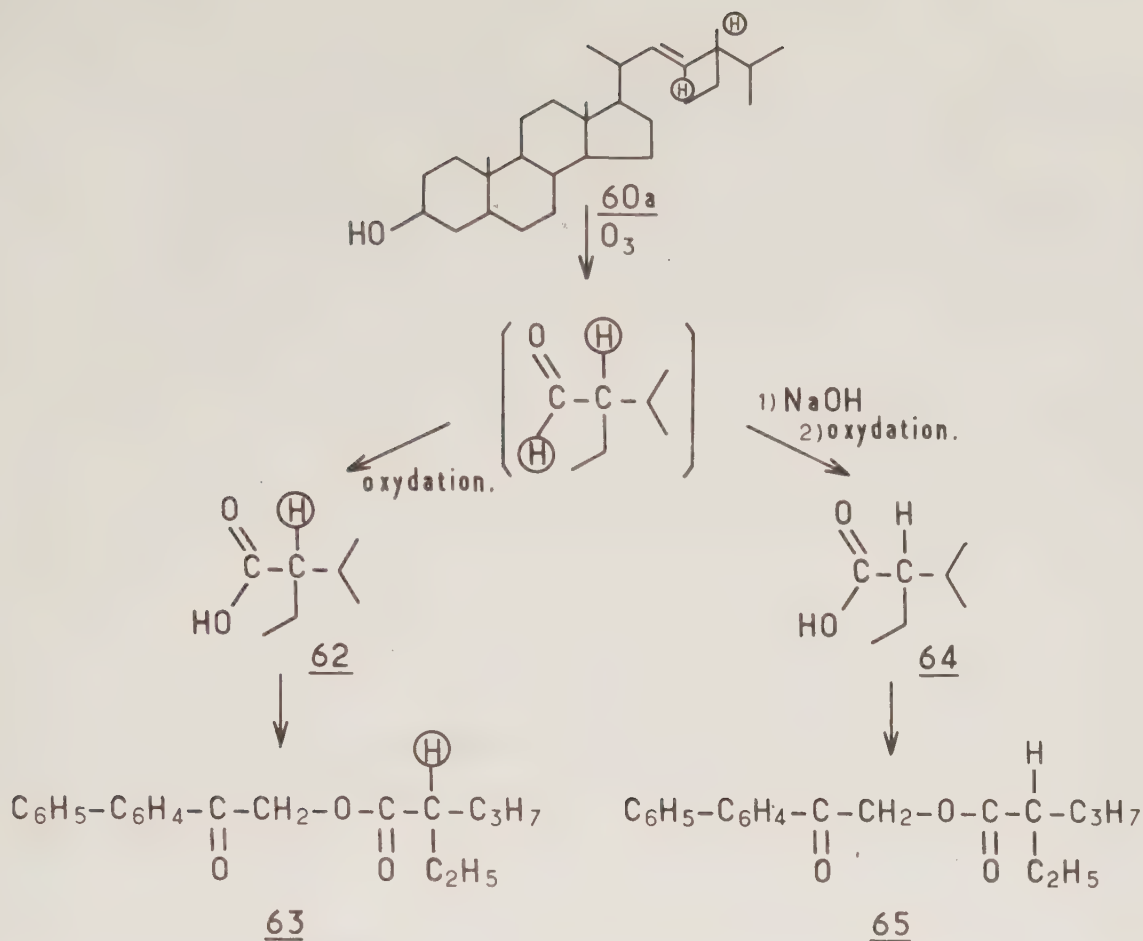
Ceci peut s'expliquer, soit par un important effet isotopique qui aurait lieu au cours de la rupture des liaisons C-H et C³-H, soit par l'existence de plusieurs voies de formation de la double liaison C-22, C-23, dont l'une impliquerait la migration de l'atome d'hydrogène du carbone 23 sur le carbone 24 en accord avec la voie e, et l'autre la perte d'un atome d'hydrogène en C-23.

Afin de poursuivre cette étude nous nous sommes proposés de localiser les atomes de tritium résiduels dans le stérol 60a.

Une fraction du composé 60a a été soumise à une dégradation par ozonolyse en milieu neutre (48). Après oxydation de l'ozonide par le réactif de Jones (49), l'acide éthyl-2 méthyl-3 butyrique 62 a été isolé sous forme de son ester p-phényl phénacylique 63.

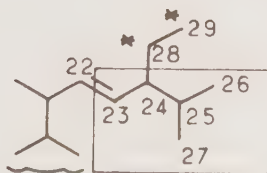
La deuxième fraction soumise à la même dégradation par ozonolyse, a été échangée en milieu basique puis oxydée selon Jones et l'acide 64 a été isolé sous forme de son ester p-phénylphénacylique 65.

Les deux esters 63 et 64 ont été recristallisés à radioactivité constante.



Etude comparative des rapports de radioactivité des composés 61, 63 et 65.

La comparaison des rapports de radioactivité du lanostérol 45 $^3\text{H}/^{14}\text{C}$: 4, 36 et de l'ester non échangé 63 $^3\text{H}/^{14}\text{C}$: 2, $28 \pm 0, 31$ nous montre qu'au cours de la double méthylation, un des atomes de tritium a migré sur un des atomes de carbone de la chaîne latérale: C-24, C-25, C-26 ou C-27*



* Les résultats obtenus au chapitre I excluent la présence d'atomes de tritium sur les carbones 28 et 29.

L'ester 65, obtenu après traitement par la soude (afin d'échanger l'atome de tritium éventuellement présent en position α de la fonction ester 65) présente un rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$: $0,44 \pm 0,15$ (perte de 80 % de la radioactivité en tritium par rapport au composé 63) ^{*}. Un atome d'hydrogène a donc migré sur le carbone 24, ce qui est en accord avec la voie de biosynthèse e:

La différence des rapports de radioactivité $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ entre l'acétate de l'époxy-22, 23 stigmastanol 61 (3, 32) et de l'ester non échangé 63 (2, 28) montre qu'une partie de la radioactivité en tritium est localisée sur le carbone 23.

Cependant ces résultats ne nous permettent pas d'expliquer la valeur apparemment trop faible du rapport $^3\text{H}/^{14}\text{C}$: 3, 32 obtenu pour le composé 61, la voie de biosynthèse e laissant prévoir un rapport de 4, 36 comparable à celui du lanostérol.

CONCLUSIONS

L'étude de l'incorporation du mélange de lanostérol $23\text{-}^3\text{H}$ et de lanostérol $26, 27\text{-}^{14}\text{C}$ nous a permis de montrer:

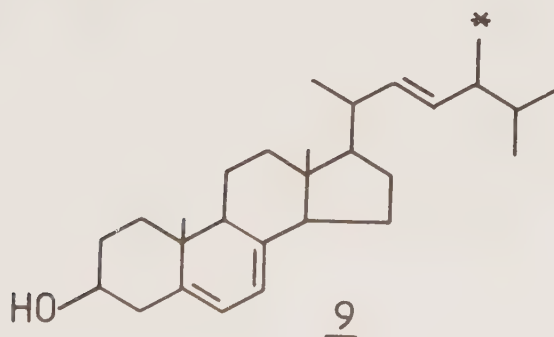
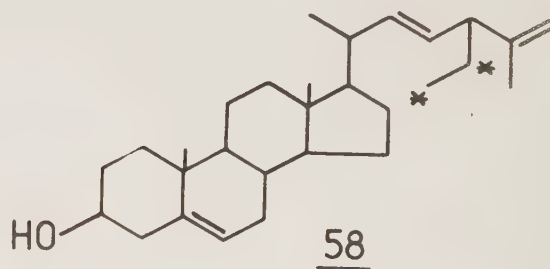
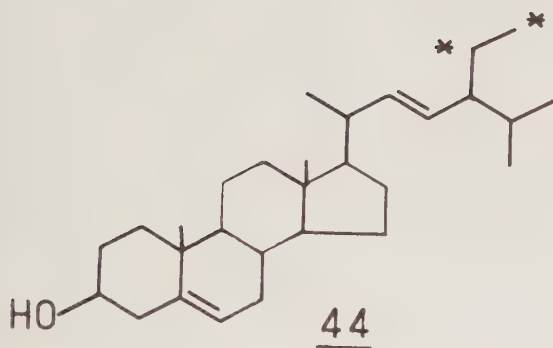
1- que la biosynthèse des stérols 38a et 39a ne peut procéder par la voie d (voir schéma V p.12),

2- que la double liaison C-22, C-23 présente dans le stérol 39a, peut être introduit, lors de la stabilisation du carbocation intermédiaire 31 par migration d'un atome d'hydrogène du carbone 23 sur le carbone 24 (voie e). Ce mécanisme est à rapprocher de celui intervenant lors de la formation des intermédiaires méthyléniques formés au cours de

^{*} Dans les conditions d'échange utilisées, nous avons montré au chapitre II que l'atome d'hydrogène en 24 est échangé à des pourcentages variant entre 60 % et 80 %.

la réaction de mono-méthylation (28, 29, 30).

Le mode d'introduction de la double liaison C-22-C-23 diffère, dans ce cas, de celui mis en évidence lors de la biosynthèse de la ramification éthyle en C-24 du poriférostérol 44 (voie a) (33), du 24 éthyl-cholesta-5, 22, 25-trien-3 β -ol 58 (50), et de l'ergostérol 9 (52).



CHAPITRE IV

ETUDE DE LA TRANSFORMATION DU STIGMASTANOL
EN STIGMASTEN-22, OL-3 β .

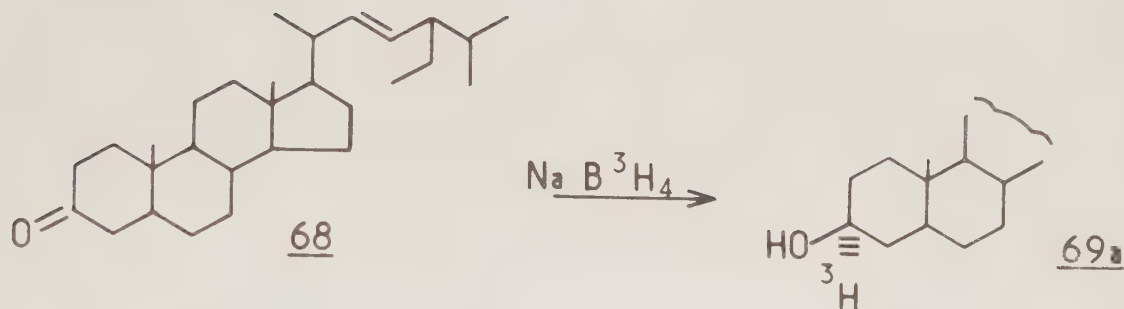
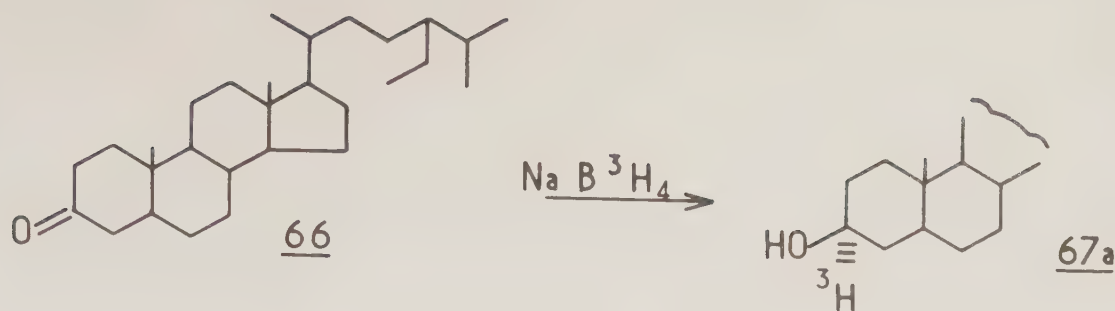
CHAPITRE IV .

Dans le chapitre précédent nous avons montré que la double liaison C-22, C-23 présente dans le stérol 39a peut être introduite par migration d'un atome d'hydrogène du carbone 23 sur le carbone 24.

Si cette voie de biosynthèse était unique, on aurait dû obtenir pour l'acétate de l'époxy-22, 23 stigmastanol 61 un rapport voisin de celui du lanostérol de départ. L'existence d'une seconde voie de biosynthèse impliquant la perte d'un des atomes d'hydrogène portés par le carbone 23, en particulier lors de la transformation du stigmastanol 38a en stigmasten-22, ol-3 β 39a, conduirait à un composé 39a de rapport inférieur à 4,36.

Nous avons étudié l'interconversion stigmastanol 38a — stigmasten-22, ol-3 β 39a et pour cela préparé ces deux composés tritiés en position 3 α .

Le stigmastanol a été oxydé par le réactif de Jones en stigmastanone 66 correspondante. La réduction de ce composé par le borohydrure de sodium tritié conduit au stigmastanol 3 α -³H 67a (activité spécifique 4,16 10⁹ dpm/mme). De la même manière nous avons préparé le stigmasten-22, ol-3 β , 3 α -³H 69a (activité spécifique 5,9 10⁹ dpm/mme).



a) Etude de l'incorporation du stigmastanol $3\alpha\text{-}^3\text{H}$ 67a.

Les cellules de Dictyostelium discoideum en croissance ont été incubées en présence de stigmastanol $3\alpha\text{-}^3\text{H}$ 67a (radioactivité introduite $5 \cdot 10^7$ dpm, 5 mg). Les cellules récoltées ont été saponifiées, la fraction neutre isolée ($9,2 \cdot 10^6$ dpm, taux d'incorporation calculé par rapport à la radioactivité introduite 18,5%) a été chromatographiée sur colonne dans les conditions habituelles.

La fraction correspondant aux phytostérols ($4,18 \cdot 10^6$ dpm) a été acétylée et époxydée. L'acétate de stigmastanol 70b ($3,57 \cdot 10^6$ dpm) a été séparé par chromatographie sur couche mince de l'acétate de l'époxy-22, 23 stigmastanol 72b ($4,23 \cdot 10^5$ dpm, taux d'incorporation calculé par rapport à la radioactivité introduite dans les cellules: 4,7%). Ce dernier, après addition d'entraîneur, a été cristallisé à radioactivité spécifique constante (Tableau VI). Par saponification du composé 72b, nous avons obtenu

l'époxy-22, 23 stigmastanol 72a, dont l'activité spécifique est identique à celle de l'acétate 72b. L'oxydation de cet alcool par le réactif de Jones conduit à l'époxy-22, 23 stigmastanone 73 dépourvue de radioactivité.

Ce résultat montre:

-1- que la transformation du composé saturé en insaturé a lieu sans randomisation.,

-2- que la double liaison C-22, C-23 peut être introduite sur la chaîne latérale saturée des stérols après l'alkylation en 24.

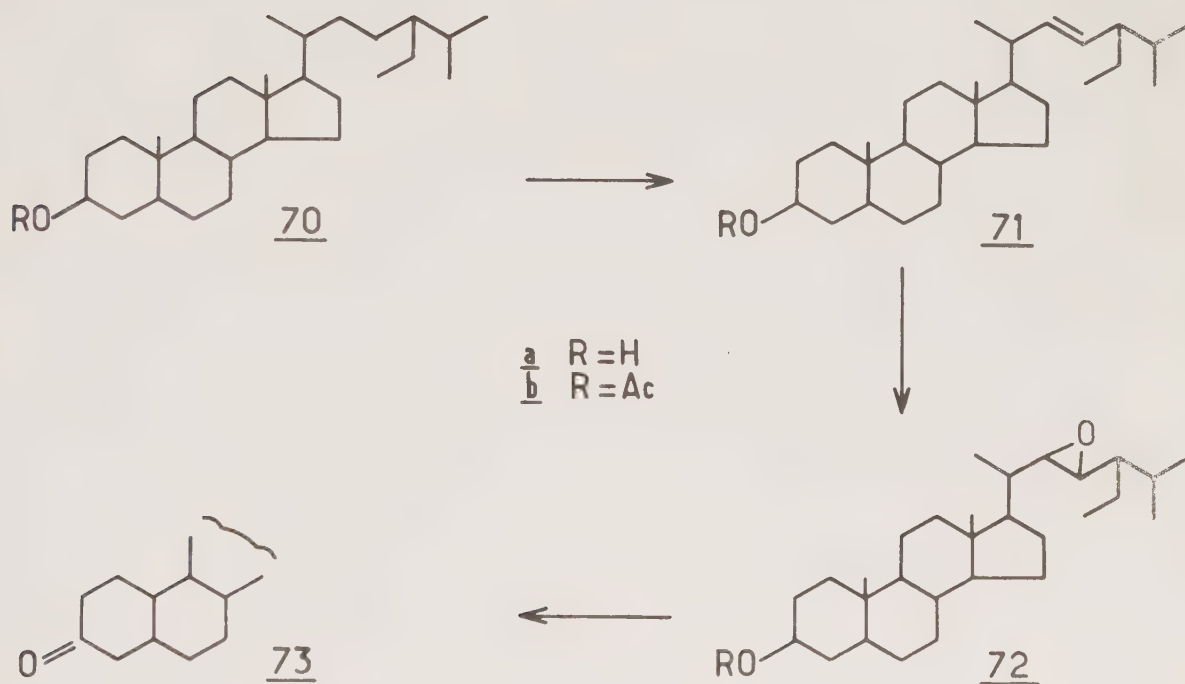


TABLEAU VI.

Composés	Radioactivité spécifique exprimée en dpm/mg/min.					
	Avant cristal- lisation.	1 ^è cris- tallisa- tion	6 ^è cris- tallisa- tion	7 ^è cris- tallisa- tion	8 ^è cris- tallisa- tion	9 ^è cris- tallisa- tion.
Acétate d'époxy-22, 23 stigmastanol <u>72b</u>	1048 $\pm$ 46	952 $\pm$ 27	451 $\pm$ 16	436 $\pm$ 21	430 $\pm$ 16	435 $\pm$ 22
Epoxy-22, 23 stigmas- tanol <u>72a</u>	425 $\pm$ 20	430 $\pm$ 19				
Epoxy-22, 23 stigmas- tanone <u>74</u>	13	< 3				

Les résultats obtenus lors de l'incorporation du mélange de lanostérol $23\text{-}^3\text{H}$ et $26, 27\text{-}^{14}\text{C}$ (chapitre III) et du stigmastanol $3\alpha\text{-}^3\text{H}$ conduisent à envisager deux voies de biosynthèse pour le composé 39a :

1- la voie e conduisant du lanostérol au stigmasten-22, ol-3 β 39a

en entraînant la migration d'un atome d'hydrogène du carbone 23 au carbone 24 (voir chapitre III).,

2- une voie de biosynthèse conduisant du stérol saturé 38a au stérol insaturé 39a en introduisant une double liaison en 22, 23.

L'existence de ces deux voies de biosynthèse nous permet d'expliquer la valeur de 3, 32 obtenue pour le rapport $T/^{14}\text{C}$ de l'acétate de l'époxy-22, 23 stigmastanol 61 (voir p.11).

Ce résultat implique que le stérol saturé 38a se forme à partir du lanostérol via le carbocation 31 en conservant les deux atomes d'hydrogène en 23 et que la transformation du stérol insaturé en stérol saturé n'a pas lieu. Pour vérifier ce point, nous avons étudié la transformation du stigmasten-22, ol-3 β 39a en stigmastanol 38a.

b) Etude de l'incorporation du stigmasten-22, ol-3 β , ^3H -3 α 69a.

Les cellules de Dictyostelium discoideum ont été incubées en présence du stigmasten-22, ol-3 β , $3\alpha\text{-}^3\text{H}$ 69a (radioactivité introduite: $5,9 \cdot 10^7$ dpm, 4mg). Les cellules récoltées ont été saponifiées, la fraction neutre isolée ($17,7 \cdot 10^7$ dpm, taux d'incorporation calculé par rapport à la radioactivité introduite 30%) a été chromatographiée sur une colonne dans les mêmes conditions que précédemment.

La fraction correspondant aux phytostérols ($6,7 \cdot 10^6$ dpm) a été acétylée et époxydée. L'acétate de stigmastanol 74b a été séparé par chromatographie sur couche mince de l'acétate de l'époxy-22, 23 stigmastanol 75 ($6,25 \cdot 10^6$ dpm).

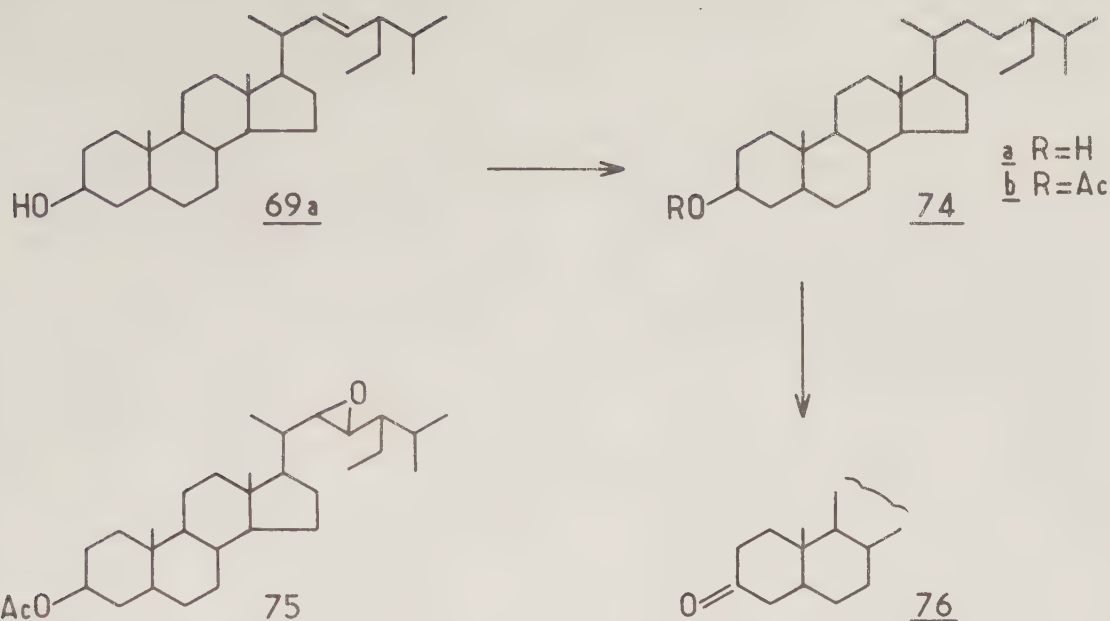
L'acétate de stigmastanol ($1,13 \cdot 10^5$ dpm, taux d'incorporation calculé par rapport à la radioactivité introduite dans les cellules: 0,61 %) a été cristallisé à radioactivité spécifique constante (Tableau VII). Par saponification du composé 74b, nous avons obtenu le stigmastanol 74a dont l'activité spécifique est identique à celle de l'acétate 74b. L'oxydation de cet alcool par le réactif de Jones conduit à la stigmastanone 76 dépourvue de radioactivité.

Cette expérience montre que la transformation du composé 22, 23 insaturé 39a en stigmastanol 38a est possible in vivo dans les conditions de travail, sans randomisation.

Cependant il faut noter le taux de cette conversion (0,61 %), beaucoup plus faible que celui de la transformation inverse (4,7 %).

TABLEAU VII .

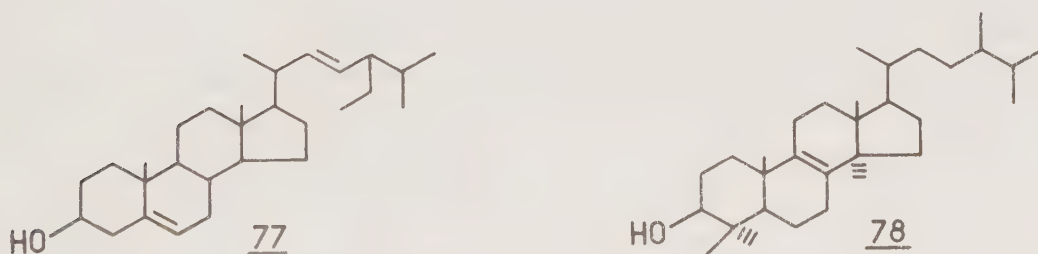
Composés	Radioactivité spécifique exprimée en dpm/mg/mg			
	Avant cristallisation	1 ^{ère} cristallisation	2 ^{ème} cristallisation	3 ^{ème} cristallisation
Acétate de stigmastanol <u>74b</u>	3629 $\pm$ 145	1364 $\pm$ 79	922 $\pm$ 57	939 $\pm$ 60
stigmastanol <u>74a</u>	927 $\pm$ 58	930 $\pm$ 62		
stigmastanone <u>76</u>	20	< 5		



CONCLUSIONS.

Cette étude a montré que la transformation du stigmasterol 38a en stigmasterol-22, ol-3 β 39a est possible in vivo et est largement prépondérante sur la réaction inverse. La double liaison C-22, C-23 peut donc être introduite après l'alkylation en C-24.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par Heftmann et coll(53) montrant que le β -sitostérol 43 peut être le précurseur du stigmasterol 77; et de ceux d'Akhtar et coll(51) montrant que la double liaison C-22, C-23, présente dans la chaîne latérale de l'ergostérol peut être introduite après la méthylation en 24, notamment dans le méthyl-24 dihydro-24, 25 lanostérol 78.



CONCLUSIONS GENERALES :

Les résultats obtenus concernant la biosynthèse du stigmastanol 38a et du stigmasten-22, ol-3 β 39a, stérols du myxomycète Dictyostelium discoideum ont montré:

1- que ces deux stérols incorporent cinq atomes de deuterium dans la ramification éthyle présente sur le carbone 24 de la chaîne latérale, lorsque l'organisme est cultivé en présence de méthionine méthyl-CD₃. Ce résultat nous a permis d'éliminer la voie de biosynthèse a (cf. schéma V p. 11),

2- que le lanostérol 45 peut être converti in vivo en stérol saturé 38a et en stérol insaturé 39a sans perte de l'atome d'hydrogène porté par le carbone 24. Cet atome d'hydrogène migre lors de l'alkylation en 24 du carbone 24 au carbone 25. Ceci exclut donc les voies de biosynthèse b et c (schéma V, p.11),

3- que le lanostérol 45 peut être converti in vivo en stérol saturé 38a sans perte des atomes d'hydrogène portés par le carbone 23. Par contre, la transformation du lanostérol en stérol insaturé 39a conduit à la perte de 25 % de ces hydrogènes. Par dégradation de la chaîne latérale du stérol 39a, nous avons montré qu'un atome d'hydrogène migre du carbone 23 au carbone 24 en accord avec la voie de biosynthèse e.,

4- que le stérol saturé 38a peut être converti in vivo en stérol insaturé 39a, la double liaison C-22, C-23 pouvant être introduite après la double méthylation en C-24. Nous avons montré également que la transformation inverse peut également avoir lieu mais avec des rendements plus faibles.

Les résultats obtenus montrent que la double liaison C-22, C-23 présente dans le stigmasten-22 ol-3 β 39a de Dictyostelium discoideum

peut être formé par deux voies de biosynthèse:

a) par élimination de deux atomes d'hydrogène l'un en C-22 l'autre en C-23 du stigmastanol 38a et indépendamment de l'alkylation en C-24 ,

b) au cours de la biosynthèse de la ramification C-24 éthyle, par élimination d'un hydrogène en C-22 accompagné de la migration d'un hydrogène C-23 en position C-24.

Cependant la voie de biosynthèse du stérol saturé n'a pu être prouvée mais:

- la voie a a été éliminée par incorporation de méthionine méthyl- CD_3 .,

- les voies b et c ont été éliminées par l'étude de l'incorporation du lanostérol 24- ^3H . En effet si la voie c avait lieu pour le composé saturé 38a , la transformation stérol saturé - stérol insaturé qui a été démontré, aurait conduit à un ester p-phényl phénacylique 57 échangé présentant un un rapport $\text{T}/^{14}\text{C}$ inférieur à celui du lanostérol de départ.

- les voies d et e ont été éliminées par l'étude de l'incorporation du lanostérol 23- ^3H .

- la voie de biosynthèse f restante semble donc la seule possibilité qui soit en accord avec nos résultats.

PARTIE EXPERIMENTALE

Appareils et techniques utilisés

Les spectres de masse ont été enregistrés sur un spectromètre de masse MS-9 (A.E.I.).

Les chromatographies en phase vapeur ont été effectuées sur un appareil Chromagaz modèle C.G.1 (Profit, Paris) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme.

Les chromatographies sur couche mince d'acide silicique Merck ont été effectuées tant à des fins analytiques que préparatives par une ou deux migrations dans les systèmes de solvants:

- n-butanol, acide acétique, eau (4,1,1 v/v) pour la méthionine,
- acétate d'éthyle-hexane (25:75) pour les stérols libres et les esters p-phényl phénacyliques,
- acétate d'éthyle-hexane (15:85) pour les acétates des époxy-22, 23, stigmastanol de Dictyostelium discoideum.
- acétate d'éthyle-hexane (10:90) pour les acétates des époxy-24, 25 lanosterol.

Les plaques ont été révélées par pulvérisation, soit d'acide sulfurique à 50 %, puis chauffage au moyen d'une lampe infrarouge soit d'une solution de rhodamine ou simplement observées en lumière ultraviolette.

Les chromatographies sur colonne ont été faites avec des adsorbants tels que l'alumine Merck ou l'acide silicilique Mallinckrodt 100 mesh. Les produits sont élués avec les solvants:

- éther de pétrole
- éther de pétrole-benzène
- benzène
- benzène-éther
- éther
- méthanol

Les mesures de radioactivité ont été effectuées sur un spectromètre à scintillation liquide "Nuclear Chicago, Mark I" équipé d'un standard externe.

CHAPITRE I

Synthèse de la méthionine trideutériée (36)

Dans un ballon à trois cols muni d'un réfrigérant à carboglace et d'un agitateur magnétique, on place 5g de DL-homocystine. Le ballon et le réfrigérant étant maintenu à -80° par un mélange acétone carboglace, on condense 150 cm^3 d'ammoniac préalablement séchés par passage du gaz ammoniac sur une colonne de potasse. On ajoute alors 2,5 g de sodium par petite portion jusqu'à apparition d'une coloration bleue persistante due à l'excès de sodium. Le système étant toujours maintenu à -80° on entraîne par un faible courant d'azote 10 g d'iodure de méthyle deutérié. Afin de maintenir la coloration bleue de la solution durant l'addition de l'iodure de méthyle on s'assure que dans la réaction, il ne reste plus d'homocystine libre en faisant réagir une quantité aliquote du mélange réactionnel sur une solution de nitroprussiate à 10 %, fraîchement préparée. En absence de groupe S-H libre la solution de nitroprussiate donne une coloration jaune.

Le mélange réactionnel est ramené à température ambiante et on laisse l'ammoniac s'évaporer pendant une nuit. Le résidu jaunâtre est repris par 100 ml d'eau puis purifié sur une colonne d'Amberlite IRC 50 (H^+). La méthionine éluée par l'eau est cristallisée dans un mélange eau-éthanol 1:2 v/v. La méthionine est ensuite analysée par chromatographie sur couche mince et présente un R_f identique à celui d'un échantillon authentique.

Le spectre de masse de l'ester éthylique du composé obtenu présente un pic moléculaire à m/e 180 ($177 + 3$).

Cultures de Dictyostelium discoïdeum en présence de méthionine Me-CD₃.

20 litres de milieu de culture (par litre: glucose, 2g; KH_2PO_4 , 13,6g; $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, 2g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 500 μg ; thiamine, 500 μg ; pH 7 ajusté avec KOH; stérilisation, 15 min à 120°) sont ensemencés par une préculture (100 ml) de E.coli 304D (méthionine less), en présence de 0,15 g par litre de méthionine Me-C²H₃. Après 24 heures à 37°, les cultures sont centrifugées et les cellules microbiennes, humides (60g), sont conservées à -15°.

Par ailleurs, dans 20 boîtes de Pétri de 160 mm de diamètre sont coulés stérilement 50 ml du milieu solide, tamponné à pH 6 (54). Chaque boîte est ensemencée, par étalement, avec 0,4 ml d'une culture de E.coli âgée de 24 heures, contenant 3 à 5 têtes sporulées de Dictyostelium discoïdeum vI 12/M 1 provenant d'une préculture âgée de moins d'une semaine. Les boîtes sont incubées à 23-24° jusqu'à complète maturation des spores (2 à 3 jours). Les spores de Dictyostelium discoïdeum récoltés et les cellules deutériées de E.coli 304 D sont mises en suspension dans un fermenteur contenant 10 litres de solution tampon Sørensen M/60 pH 6 (55). La culture aérée 31/mn et agitée (200 tours/mn) est incubée à 23° pendant 48 heures environ; des prélèvements sont effectués périodiquement; leur densité optique mesurée sous 550 nm après centrifugation à 3000 tours/mn pendant 6 mn, permet de suivre la digestion progressive de E.coli par Dictyostelium discoïdeum et le développement du myxomycète.

A la fin de la phase végétative, la culture est centrifugée; on recueille 27 g de cellules humides.

Extraction des stérols 38a et 39a.

36 g de cellules humides sont hydrolysés par ébullition en présence de 120 ml d'acide chloridrique concentré et 800 ml d'eau. L'insaponifiable est extrait au chlorure de méthylène, la solution est lavée à neutralité, séchée sur sulfate de soude et évaporée. Cette fraction neutre, 800 mg, est chromatographiée sur 30 g d'acide silicique, par élution au benzène

on isole 80 mg d'une fraction homogène sur chromatoplaque d'acide silicique. Après recristallisation dans le méthanol, on obtient 67 mg; F. 148°. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse des dérivés préparés selon Carter et Gaver (56) indique la présence de 20 % du composé 38a et 80 % du composé 39a (colonne: célite traitée par l'hesaméthylidisilane 1 % SE 30 ou respectivement 1 % SE 52; t. 225° débit d'azote 55 cc/mn). Les deux stérols ont les mêmes R_f , les mêmes volumes de rétention et les mêmes spectres de masse que des échantillons authentiques.

Préparation des acétates des stérols 38a et 39a.

10 mg de stérols 38a et 39a sont dissous dans 0,3 ml de pyridine anhydre; on ajoute 0,4 ml d'anhydride acétique et on laisse 18 heures à la température ambiante. Le mélange réactionnel est repris par 2 ml d'eau et extrait à l'éther; la solution étherée est lavée avec une solution d'HCl, de bicarbonate de soude, puis à l'eau et évaporée : 8,7 mg, F. 145-148° (méthanol).

Dégradation de la chaîne latérale du stérol 39b.

39 mg du composé 39b sont dissous dans 4 ml de chlorure de méthylène, refroidi à -80° et soumis pendant 5 mn à un courant d'ozone (100 cm³/mn à 4 %). On agite quelques minutes en réchauffant légèrement et on soumet de nouveau à l'ozonolyse pendant 2 mn. La solution est réchauffée à la température ordinaire, le solvant est évaporé sous vide et l'ozonide est oxydé par 250 mg d'oxyde d'argent fraîchement préparé et mis en suspension dans 2 ml de soude caustique 5N. Le mélange est chauffé 3 heures à 80° puis acidifié par l'acide sulfurique; on extrait 8 fois à l'éther la phase organique, on lave et on évapore le solvant. Le résidu est alors neutralisé par 125 ml de soude caustique 0,1 N; la solution du sel de sodium est reprise par 4 ml d'éthanol et 3,75 ml d'eau; on ajoute 35 mg de bromure de phényl phénacyle et on porte au reflux 3 heures. La phase organique est extraite

au chlorure de méthylène : 66 mg. Ce produit soumis à deux purifications successives sur plaque d'acide silicique donne 4 mg du composé 41 c: F.66-68°. Cette opération nous a permis d'obtenir 6 mg de stérol saturé 38a. Le dérivé triméthylsilylé de 38a a été obtenu par traitement du stérol par l'hexaméthyl-disilazane en présence de triméthylchlorosilazane (56).

Préparation de l'éthyl-2, isopropyl-2 malonate d'éthyle 42a (39)

7, 5 g de sodium sont dissous dans 200 ml d'éthanol absolu; à cette solution on ajoute goutte à goutte 40 g de malonate d'éthyle en maintenant la température à 50°. Après une demie heure, on ajoute le bromure d'isopropyle et on porte à reflux pendant quatre heures. L'isopropyl malonate d'éthyle est extrait à l'éther; la solution étherée est lavée à neutralité, séchée et évaporée: 43, 4g. Par distillation sous vide, on récupère 18, 9g de ce composé avec un rendement de 43, 2%; E. : 98°/12 mm de Hg.

7 g de sodium sont alors dissous à chaud dans 130 ml d'alcool tertio-butylque. L'isopropyl-2 malonate d'éthyle: 15 g est ajouté goutte à goutte au tertio-butylate de sodium. A ce mélange, agité pendant deux heures, on ajoute 8, 2 g de bromure d'éthyle. Le mélange réactionnel est alors porté à reflux pendant quatre heures, puis repris par 100 ml d'eau est extrait à l'éther.

Le produit 42a est purifié par deux chromatographies successives en phase gazeuse; une première préparative sur colonne silicone SE-30 à 10% (T_f : 90°, débit d'azote: 60 cm³/mn) et une deuxième sur colonne de diéthylène glycol succinate à 15% (T : 90°, débit d'azote 60 cm³/mn).

Analyse: trouvée C 62, 35%^f, H 9, 56%, O 28, 08%
calculée C 62, 56%, H 9, 56% O 27, 79%

Préparation de l'acide éthyl-2, deutério-2, méthyl-3 butyrique 40c (40)

A 135 mg d'éthyl, isopropyl malonate d'éthyle 42a, en solution dans 0,5 ml d'éthanol, on ajoute 1,25 g de potasse caustique dans 1 ml d'eau. Cette solution est portée à reflux 3 heures puis acidifiée à froid puis extraite à l'éther. La phase étherée est lavée, séchée et évaporée: 102 mg d'acide 42b, rendement 98%. Le produit obtenu à 55° en tube scellé en présence de 2 ml d'eau lourde pendant 18 heures. L'eau lourde est évaporée sous vide et l'opération est recommencée. Après distillation de l'eau sous vide, le résidu est chauffé à 180° sous 35mm de Hg pendant deux heures puis distillé (44 mg, rendement 57%, E. 138°/40 mm de Hg.

Préparation de l'ester p-phényl phénacylique 41c de l'acide 40c.

44 mg d'acide 40c sont neutralisés par 1,65 ml de soude 0,1 N; la solution de sel de sodium est reprise par 1 ml d'éthanol et 0,8 ml d'eau. On ajoute 45 mg de réactif et on porte à reflux 3 heures. La phase organique est extraite au chlorure de méthylène. Le produit isolé est soumis à deux purifications successives sur plaque d'acide silicique: 45 mg, F. 66-68°.

CHAPITRE II

Préparation de l'acétoxy-3, époxy-24, 25 lanosten-8 47

A 15 g d'acétate de lanostérol en solution dans 200 ml d'éther, on ajoute goutte à goutte une solution étherée contenant 9,15 g d'acide p-nitroperbenzoïque. Après 30 mn d'agitation le mélange réactionnel est lavé avec une solution saturée de sulfite de sodium, de bicarbonate de sodium et à l'eau jusqu'à neutralité. Le solvant, séché sur sulfate de sodium, est évaporé: 15 g de produit est purifié sur une colonne contenant 500 g d'alumine. Les fractions éluées par le mélange éther de pétrole-benzène 1-1 v/v ont été identifiées à l'acétoxy-3, époxy-24, 25 lanosten-8 et cristallisées dans le méthanol: 6,3 g.

Fusion 182°-185°

Rendement 40,3 %

Spectre de masse pic moléculaire à m/e 484

Préparation de l'acétoxy-3, ol-24, méthoxy-25 lanosten-8 48

5,1 g du composé 47 en solution dans 500 ml d'éthanol sont traités par 3,5 ml d'acide perchlorique à température ambiante. On laisse en contact ce mélange pendant 12 heures et on précipite la phase organique par addition d'une solution saturée de carbonate de sodium. Le précipité est filtré puis repris par l'éther, lavé à l'eau saturée de chlorure de sodium, séché puis cristallisé dans l'éther de pétrole: 4,2 g.

Fusion 125°-128°

Rendement 68,5 %

Spectre de masse: pic moléculaire à m/e 516

N.M.R. singulet à 3,2 p.p.m dû au groupe méthoxy.

Préparation de l'acétoxy-3, trisnor lanosten-8, al-24-49a

A 2,5 g du composé 48 en solution dans 200 ml de benzène anhydre, on ajoute 3 g de tétraacétate de plomb sec et fait passer un courant d'azote pendant 10 mn. Cette solution est ensuite irradiée pendant 40 mn avec une lampe Hanau haute précision Q 81. La solution est filtrée sur une colonne de gel de silice. L'aldéhyde 49a obtenu après évaporation du solvant est cristallisé dans le méthanol: 1,2 g.

Fusion : 138°-141°

Rendement: 56 %

Spectre de masse: pic moléculaire à m/e 442

N.M.R.: triplet à 9,8 ppm dû au proton aldéhydique.

Préparation de l'acétoxy-5 trisnor lanosten-8, al-24, ³H-24 49b

240 mg d'aldéhyde 49b dissous dans 10 ml de méthanol sont réduits par 0,3 mg de borohydrure de sodium tritié (activité 3 mc). Après une heure d'agitation on a ajouté du borohydrure de sodium non marqué jusqu'à réduction complète de l'aldéhyde 49a. Après extraction de cette solution à l'éther on a obtenu l'alcool 50. On dissout cet alcool dans 100 ml de benzène anhydre et on ajoute 15 g de carbonate d'argent* fraîchement préparés (47) et on porte à reflux pendant 3 heures. La chromatographie

* 30 g de celite sont mis en suspension par agitation magnétique dans une solution de méthanol chlorhydrique à 40 % pendant 3 heures puis filtrée et lavés jusqu'à neutralité.

A 30 g (200 mmoles) de nitrate d'argent dissous dans 200 ml d'eau distillée on ajoute 30 g de celite purifiée et on agite magnétiquement 5 mn; lorsque la solution est homogène on y ajoute sous agitation une solution 30g (105 mmoles de CO_3Na_2 dans 300 ml d'eau distillée. On agite pendant 10 mn après la fin de l'addition, on filtre le précipité jaune vert, le lave à l'eau jusqu'à neutralité et le sèche.

sur couche mince du produit de la réaction montre une transformation complète de l'alcool 50 en aldéhyde 50b.

Préparation de l'isopropyl triphénylphosphine

A 1 g de triphénylphosphine en solution dans 2,7 ml de benzène, on ajoute 0,150 ml d'iodure d'isopropyle. Ce mélange est chauffé dans un tube scellé à 90° pendant 60 heures. L'isopropyltriphénylphosphine qui précipite par refroidissement est filtré, séché sous vide: 350mg.

Fusion: 190°.

Préparation du lanostérol 24-³H 45a

A 215 g d'isopropyl triphénylphosphine en suspension dans 12,5 ml de THF anhydre on ajoute 0,24 ml de N.butyl lithium. Cette solution est maintenue sous azote pendant 30 mn. On ajoute alors 200 mg d'aldéhyde et on porte à reflux pendant deux heures. Après évaporation du solvant, on extrait l'acétate de lanostérol 24-³H à l'éther qui est purifié sur une plaque d'acide silicique puis cristallisé dans le méthanol 40 mg.

20 mg de cet acétate sont hydrolysés à chaud par 65 mg d'hydrure de lithium aluminium dans l'éther anhydre. Après extraction et purification sur une plaque d'acide silicique imprégnée de nitrate d'argent on trouve 15 mg de lanostérol 24-³H 45a.

Préparation du lanostérol 26-27 ¹⁴C 45b

Le lanostérol 26-27 ¹⁴C est préparé selon la même technique que nous avons employé pour la synthèse du lanostérol 24-³H 45a. Toutefois on a effectué la condensation de Wittig en utilisant 250 mg d'aldéhyde 45a non marqué et l'iodure d'isopropyle 1-3 ¹⁴C triphénylphosphine (activité de l'iodure d'isopropyle: 2mC/mmoles 123 mg).

Cultures de Dictyostelium discoideum en présence du mélange de lanostérol 24-³H 45a et de lanostérol 26-27 ¹⁴C 45b.

20 litres de milieu de culture (Peptone Difco, 1,56 %; Yeast extract Difco, 0,28 %; NaCl 0,56 %; glucose, 0,1 %; pH 7,4 ajusté avec KOH; stérilisation , 15 mn à 120°) sontensemencées par une préculture de E.coli B/r. Après 24 heures à 37°, les cultures sont centrifugées, lavées à l'eau distillée stérile et les cellules microbiennes humides sont mises en suspension dans un litre de tampon Sorensen M/60 pH 6 (54). Le nombre de cellules contenues dans la suspension est déterminé par la mesure de la densité optique au spectrophotomètre (Spectronic 20 Bausch and Lomb) étalonné au préalable avec des échantillons de cultures sur lesquels ont été effectuées des numérations à l'aide d'une cellule-compteur-germes.

Les cultures et la récolte des spores de Dictyostelium discoideum sont effectuées comme précédemment (chapitre I).

Les spores de Dictyostelium discoideum récoltées et les cellules de E.coli B/r sont mises dans un fermenteur contenant 10 litres de solution tampon Sorensen M/60 pH 6. Au début de cette phase végétative, on ajoute une solution* contenant 10mg de lanostérol marqué ($2,5 \cdot 10^6$ dpm ¹⁴C) et on laisse la culture sous agitation et sous azote pendant 24 heures. La culture est ensuite aérée 3 l/mn, agitée 200 tours/mn et incubée à 23° pendant 48 heures environ.

A la fin de la phase végétative, la culture est centrifugée, on recueille 52 g de cellules humides.

* le lanostérol : 10 mg est dissous dans 3 ml d'éthanol auquel sont ajoutés 5 gouttes de Tween 80 et 13 ml d'eau distillée

Extraction des stérols 51a et 52a.

Les cellules humides sont hydrolysées dans les mêmes conditions que précédemment (cf. partie expérimentale chapitre 1, p. 53). La fraction neutre 600 mg, T/ ^{14}C : 5, 5; taux d'incorporation calculé par rapport à la radioactivité introduite 50% est chromatographiée sur 30 g d'acide silicique. La fraction correspondant aux phytostérols 83 mg, T/ ^{14}C 5, 55, 2, 2% d'incorporation calculé par rapport à la radioactivité en ^{14}C introduite est acétylée comme précédemment (cf. p. 54).

Préparation de l'acétate de l'époxy-22, 23 stigmastanol 53.

80 mg du mélange des acétates des composés 51a et 52a, en solution dans 10 ml de chloroforme sont traités par 250 mg d'acide p-nitroperbenzoïque. Après 3 heures d'agitation à froid, la solution est lavée avec une solution saturée de sulfite de sodium, de bicarbonate de soude puis à l'eau jusqu'à neutralité. On isole, après évaporation du solvant, 76 mg de produits qu'on purifie sur une plaque d'acide silicique. L'acétate de stigmastanol 51b, 14 mg; F. 145-148°, T/ ^{14}C 5, 54 est séparé de l'acétate de l'époxy-22, 23 stigmastanol 53, 56 mg; F. 75°-78° T/ ^{14}C : 5, 61; spectre de masse: pic moléculaire m/e 472.

Dégradation de la chaîne latérale du stérol 52a

80 mg du mélange des stérols 51a et 52a sont dissous dans 5 ml d'acétate de méthyle et 5 ml de méthanol, refroidis à -80° et soumis pendant 30 mn à un courant d'ozone (100 cm³/mn à 4%). On agite quelques minutes et on soumet à nouveau à l'ozonolyse pendant 15 mn. La solution est ramenée à la température ambiante, le solvant évaporé à froid et sous vide.

Une première fraction de l'ozonide dissoute dans l'acétone est oxydée par 0,5 ml de réactif de Jones^{*} (49). L'acétone est alors évaporée, l'acide éthyl-2, méthyl-3 butyrique 54 extrait à l'éther est distillé sous vide (E. 110° sous 30 mm de Hg) puis estérifié par 25 mg de bromure de p-phényl phénacyle (cf. p 54). L'ester p-phényl phénacylique 7 mg, $T/^{14}C$: 5,54 est purifié deux fois sur plaque d'acide silicique puis cristallisé dans le méthanol. La seconde fraction de l'ozonide est traitée par 0,5 ml de diméthyl sulfure (57) en présence de 2 ml de méthanol puis par une solution contenant 1,4 ml de soude aqueuse à 10% et 5 ml d'éthanol pendant 15 heures sous azote. Après oxydation par 3 ml de réactif de Jones, l'acide 56 isolé par distillation sous vide est estérifié comme précédemment. L'ester p-phényl phénacylique 57 5 mg, $T/^{14}C$ 5,55 est cristallisé dans le méthanol.

* A 10,3 g de bichromate de potassium dissous dans 30 ml d'eau distillée sont ajoutés 8,7 ml d'acide sulfurique concentrée.

CHAPITRE III

Préparation du lanostérol 23-³H 45c

200 mg de l'aldéhyde 49a sont traités par une solution contenant 3 ml de potasse méthanolique à 5%, 300 μ l d'eau tritiée (activité spécifique 1 curie /ml) et 5 ml de benzène. Après 15 heures à 70°, l'aldéhyde 49c est extrait à l'éther et cristallisé dans le méthanol: 195 mg. Le lanostérol 23-³H 45c est préparé selon Wittig comme précédemment: 70 mg (activité spécifique $8,09 \cdot 10^8$ dpm/mme).

Croissance des cellules de Dictyostelium discoideum en présence du mélange de lanostérol 23-³H 45c et de lanostérol-26,27 ¹⁴C 45b.

Les cultures des spores de Dictyostelium discoideum et des E.coli B/r sont effectuées comme précédemment(cf.chapitre II p.60). Les spores récoltés et les cellules de E.coli sont mis dans un fermenteur contenant 10 litres d'une solution tampon-Sorensen pH 6. Au début de la phase végétative, on ajoute la solution* contenant 4 mg du mélange de lanostérol 23-³H et 26,27 ¹⁴C, T/ ¹⁴C 4,36, activité en ¹⁴C 10^6 dpm. Cette culture est ensuite laissée sous agitation et sous azote pendant 24 heures, puis aérée 3l /mn, agitée 200 tours/mn et incubée à 23° pendant 48 heures environ.

A la fin de cette phase végétative, on recueille 50 g de cellules humides.

* voir note p.60

Extraction des stérols 59a et 60a .

Les cellules humides sont hydrolysées (cf. partie expérimentale chapitre I p.53

La fraction neutre 464 mg, T/ ^{14}C 4, 25, activité en ^{14}C 3, 95 10^5 dpm, taux d'incorporation calculé par rapport à la radioactivité introduite 39,5 %, est chromatographiée sur 30 g d'acide silicique. La fraction correspondant aux phytostérols 100 mg T / ^{14}C 4, 06, 2,5 % d'incorporation calculé par rapport à la radioactivité introduite en ^{14}C , est acétylée comme précédemment.

Préparation de l'acétate de l'époxy-22, 23 stigmastanol 61.

90 mg du mélange des acétates 59a et 60a, en solution dans 10 ml de chloroforme sont traités par 250 mg d'acide p-nitroperbenzoïque. La phase organique est extraite comme précédemment (cf. p 61

L'acétate de stigmastanol 59b, 17 mg T/ ^{14}C 3, 91, est séparé de l'acétate de l'époxy-22, 23 stigmastanol 61, 67 mg, T/ ^{14}C 3, 73 sur une plaque d'acide silicique.

Dégradation de la chaîne latérale du stérol 60a.

50 mg du mélange des stérols 59a et 60a sont soumis à un courant d'ozone en milieu neutre (cf. partie expérimentale chapitre II p. 61 Une fraction de l'ozonide dissoute dans 5 ml d'acétone est oxydée selon Jones (49). L'acide 62 extrait à l'éther est alors distillé sous vide E: 110°/30 mm de Hg puis estérifié par le bromure de p-phényl phénacyle comme précédemment. L'ester p-phényl phénacylique 63 purifié deux fois sur plaque d'acide silicique (5 mg, T/ ^{14}C 2, 28) est cristallisé dans le méthanol.

La deuxième fraction de l'ozonide est traitée pendant 15 heures sous azote après destruction de l'ozonide par 0,5 ml de diméthyl sulfure (57) en présence de 2 ml de méthanol, par une solution contenant 1,4 ml de soude à 10% et 5 ml d'éthanol. Après oxydation par le réactif de Jones, l'acide éthyl-2 méthyl-3 butyrique 64 est estérifié par le bromure de p-phénylphénacyl. L'ester 65 obtenu 4 mg T/ ^{14}C 0,44 est cristallisé à radioactivité contante dans le méthanol.

CHAPITRE IV

Préparation du stigmastanol 3α - ^3H 67a

100 mg de stigmastanol en solution dans 10 ml d'acétone sont traités par 0,5 ml de réactif de Jones. Après 30 mn d'agitation, on détruit l'excès de réactif par le méthanol et on extrait la phase organique à l'éther: 96 mg. La stigmastanone obtenu est analysée par chromatographie sur couche mince d'acide silicique, par chromatographie en phase vapeur (T_f : 240° , colonne SE 30 à 1%, débit d'azote 55 cc/mn) et par spectrométrie de masse.

25 mg de la stigmastanone 66 en solution dans 10 ml de méthanol, on ajoute du borohydrure de sodium tritié (1 mC); après 30 mn d'agitation sous azote, on ajoute 15 mg de borohydrure de sodium non marqué. Cette solution maintenue sous atmosphère d'azote et sous agitation pendant 1 heure, est ensuite extraite à l'éther. Le stigmastanol 3α - ^3H 67a est soumis à deux purifications successives sur plaque d'acide silicique, est cristallisé dans le méthanol: 20 mg, $10,7 \cdot 10^6$ dpm/mg).

Préparation du stigmastén-22, 1α - 3β 69a

60 mg du stérol insaturé 38a ont été oxydés en stigmastanone 68 selon le mode opératoire décrit précédemment.

50 mg de cette stigmasténone ont été réduit par 1 mC de borohydrure de sodium tritié, le stérol 69a soumis à deux purifications successives sur plaque d'acide silicique est cristallisé dans le méthanol: 40 mg, activité spécifique $14,7 \cdot 10^6$ dpm/mg.

Croissance des cellules de Dictyostelium discoideum en présence du stigmastanol 3 α -³H 67a.

Les cellules de Dictyostelium discoideum ont été incubées en présence de 5 mg de stigmastanol 3 α -³H 67a ($5 \cdot 10^7$ dpm) selon les mêmes techniques que précédemment. A la fin de la phase végétative on recueille 22 g de cellules humides.

Extraction des stérols 70a et 71a.

Les cellules humides sont hydrolysées dans les mêmes conditions que précédemment (cf. p. 53)

La fraction neutre 288 mg; $9,2 \cdot 10^6$ dpm est chromatographiée sur 40g d'acide silicique. La fraction correspondant aux phytostérols 80 mg, $4,18 \cdot 10^6$ dpm est acétylée comme précédemment.

Préparation de l'acétate de l'époxy-22, 23 stigmastanol 72b.

80 mg du mélange des acétates 70 b et 71 b en solution dans 10 ml de chloroforme sont traités par 300 mg d'acide p-nitroperbenzoïque. Après 3heures d'agitation, la phase organique est extraite comme précédemment. L'acétate de stigmastanol 70b 20,8 mg, $3,57 \cdot 10^6$ dpm a été séparé par chromatographie sur couche mince de l'acétate d'époxy-22, 23 stigmas-tanol 72b 55,6 mg, $4,23 \cdot 10^5$ dpm, taux d'incorporation calculé par rapport à la radioactivité introduite dans les cellules: 4,7%. Ce dernier après addition d'entraineur 200 mg, a été cristallisé jusqu'à obtention d'une radioactivité spécifique constante.

Préparation de l'époxy-22, 23 stig.mastanone 73

15 mg de l'acétate 72b sont hydrolysés par 100 mg d'hydrure de lithium aluminium dans l'éther anhydre à chaud. L'alcool 72a obtenu après purification sur plaque d'acide silicique possède la même radioactivité spécifique que l'acétate correspondant.

10 mg de l'alcool 72a sont oxydés par 0,5 ml de réactif de Jones. La cétone 73 obtenue, 7 mg, est purifiée sur une plaque d'acide silicique, puis cristallisée dans le méthanol.

Croissance des cellules de Dictyostelium discoideum en présence du stigmasten-22, ol-3 β , 3 α -³H 69a.

Les cellules de Dictyostelium discoideum ont été incubées en présence de 4 mg du stérol 69a, radioactivité introduite $5,9 \cdot 10^7$ dpm. A la fin de la phase végétative, on recueille 55 g de cellules humides.

Extraction du stérol 74a.

Les cellules humides sont hydrolysées dans les mêmes conditions que précédemment.

La fraction neutre 395 mg, $17,7 \cdot 10^6$ dpm, taux d'incorporation calculé par rapport à la radioactivité introduite 30%, est chromatographiée sur 40 g d'acide silicique. La fraction correspondant aux phytostérols 50 mg $6,7 \cdot 10^6$ dpm est acétylée.

Isolement de l'acétate de stigmastanol 74b.

50 mg du mélange des acétates, en solution dans 10 ml de chloroforme sont traités par 200 mg d'acide p-nitroperbenzoïque. Cette solution est agitée pendant 3 heures puis extraite au chloroforme. L'acétate de stigmastanol 8 mg, $1,13 \cdot 10^5$ dpm est séparé par chromatographie sur couche mince de l'acétate de l'époxy-22, 23 stigmastanol 75, 38 mg; $6,52 \cdot 10^6$ dpm. Après addition de 20 mg de stigmastanol entraîneur, l'acétate 74b est cristallisé jusqu'à obtention d'une radioactivité spécifique constante.

Préparation de la stigmastanone 76.

10 mg de l'acétate 74b sont hydrolysés par 100 mg d'hydrure de

lithium aluminium dans l'éther anhydre à chaud. L'alcool 74a obtenu a la même radioactivité spécifique que l'acétate 74b.

5 mg de l'alcool 74a sont oxydés par 0,5 ml de réactif de Jones. La cétone 76 obtenue, 3,5 mg soumise à deux purifications successives sur une plaque d'acide silicique est dépourvue de radioactivité.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - A.J.BIRCH, D.ELLIOTT et A.R.PENFOLD ,
Austral.J.Chem., 7, 169 (1954)
- 2- A.J.BIRCH, R.J.ENGLISH, R.A.MASSY- WESTROPP, M.SLAYTOR et
H.SMITH , Proc.Chem.Soc., 204 (1957)
- 3- G.J.ALEXANDER, A.N.GOLD et E.SCHWENK ,
J.Amer.Chem.Soc; 79, 2967 (1957)
- 4- L.W.PARKS ,
J.Amer.Chem.Soc., 80, 2023 (1958)
- 5- E.LEDERER ,
Experientia, 20, 473 (1964)
Biochem.J., 93, 449 (1964)
Israel J.Med.Sci., 1, 1129 (1965)
Quart.Rev., 23, 453 (1959)
- 6- R.B.CLAYTON ,
Quart.Rev., 19, 201 (1965)
- 7- C.J.SIH et H.W.WHITLOCK ,
Ann.Rev.Biochem., 37, 661 (1968)
- 8- G.L.CANTONI ,
J.Amer.Chem.Soc., 74, 2942 (1952)
J.Biol.Chem., 204, 403 (1953)
- 9- J.BADDILEY, G.L.CANTONI et G.A.JAMIESON.,
J.Chem.Soc., 2662 (1953)
- 10- J.BADDILEY, G.A.JAMIESON ,
J.Chem.Soc., 4280 (1954)
- 11- G.JAUREGUIBERRY, G.FARRUGIA-FOUGEROUSE, H.AUDIER et
E.LEDERER,
C.R.Acad., Sc.Paris , 259, 3108 (1964)
- 1 2- B.E.TROPP, J.H.LAW et H.M.HAYES ,
Biochemistry, 13, 1837 (1964)
- 1 3- G.JAUREGUIBERRY, M.LENFANT, B.C.DAS et E.LEDERER.,
Tetrahedron, Supp., 8, part I, 27 (1966)

- 14-M. CASTLE, G. BLONDIN et W. R. NES ,
J. Amer. Chem. Soc., 85, 3306 (1963)
- 15-S. BADER; L. GUGLIELMETTI et D. ARIGONI ,
Proc. Chem. Soc., 16 (1964)
- 16-V. R. VILLANUEVA, M. BARBIER et E. LEDERER ,
Bull. Soc. Chim. France, 1423 (1964)
- 17-M. LENFANT et J. VARENNE ,
Résultats non publiés
- 18-Y. TOMITA, A. UMORI et H. MINATO ,
Phytochemistry, 9, 555 (1970)
- 19-G. JAUREGUIBERRY, J. H. LAW, J. A. McCLOSKEY et E. LEDERER ,
C. R. Acad. Sc. Paris, 258, 3587 (1964)
- 20-M. LENFANT, G. FARRUGIA et E. LEDERER ,
C. R. Acad. Sc. Paris, 268 D, 1986 (1969)
- 21-M. F. LECOMPTE et M. LENFANT ,
Résultats non publiés
- 22-K. HOFFMANN et T. Y. LIU ,
Biochim. Biophys. Acta, 37, 364 (1960)
- 23- V. R. VILLANUEVA, M. BARBIER et E. LEDERER ,
Bull. Soc. Chim. France, 49, 389 (1967)
- 24- J. POLONSKY et M. N. RICOCH ,
Résultats non publiés
- 25- D. H. R. BARTON, D. M. HARRISON et G. P. MOSS ,
Chem. Comm., 595 (1966)
- 26- M. AKHTAR, M. A. PARVEZ et P. F. HUNT ,
Biochem. J., 100, 38 C (1966)
- 27- G. JAUREGUIBERRY, M. LENFANT, R. TOUBIANA, R. AZERAD et
E. LEDERER ,
Chem. Comm., 855 (1966)

- 28-M.AKHTAR,P.F.HUNT et M.A.PARVEZ ,
Chem.Comm., 565 (1966)
Biochem.J., 103, 616 (1967)
- 29-K.H.RAAB, N.J.de SOUZA et W.R.NES ,
Biochim . Biophys .Acta., 152, 742 (1968)
- 30-L.J.GOAD et T.W.GOODWIN.,
European J. Biochem., 7 , 502 (1969)
- 31-M.LENFANT, H.AUDIER et E.LEDERER ,
Bull.Soc.Chim.France, 2775 (1966)
- 32- Y.AKMATSU et J.H.LAW.,
J.Biol.Chem., 245, 701 (1970)
- 33-A.R.H.SMITH, L.J.GOAD, T.W.GOODWIN et E.LEDERER ,
Biochem.J. 104, 56 c(1967)
- 34- A.J.BIRCH ,
in "Chemical Plant Taxonomy", Ed. T.Swain, Academic Press,N.Y.p.163(1963)
- 35-H.SIMON et D.PALM ,
Angew.Chem.Intern.Ed., 5 , 920 (1966)
- 36-A.MURRAY et D.L.WILLIAMS ,
Organic Synthesis with Isotops, Part II, 1302 (1958), Interscience, N.Y.
- 37- E.HEFTMANN, B.E.WRIGHT et C.U.LIDDEL ,
Arch.Biochem.Biophys., 91, 266 (1960)
- 38- D.F.JOHNSON, B.E.WRIGHT, E.HEFTMANN ,
Arch.Biochem.Biophys., 97, 232 (1962)
- 39- M.KOPP et B.TCHOUBAR ,
Bull.Soc.Chim.France, 30 (1951)
- 40- A.MURRAY et D.L.WILLIAMS ,
Organic Synthesis with Isotops, Part II, 1265 (1958), Interscience, N.Y.
- 41- E.I.MERCER ,
Biochem.J., 96, 17 P (L965)
- 42-L.J.GOAD, A.S.A.HAMMAM, A.DENNIS et T.W.GOODWIN ,
Nature, 210, 1322 (1966)
- 43- M.LENFANT, M.F.LECOMPTE et G.FARRUGIA ,
Phytochemistry, sous presse

- 44- M.J.E. HEWLINS, J.D. EHRHARDT, L. HIRTH et G. OURISSON ,
European J. Biochem., 8, 184 (1969)
- 45- P.T. RUSSEL, R.T. van ALLER et W.R. NES ,
J. Biol. Chem., 242, 5802 (1967)
- 46- J. HALL, A.R.H. SMITH, L.J. GOAD et T.W. GOODWIN ,
Biochem., J. 112, 5802 (1967)
- 47- M. FETIZON et M. GOLFIER ,
C.R. Acad. Sc., Paris, 267, 900 (1968)
- 48- J.W. CORNFORTH, F.R.S., R.H. CORNFORTH, C. DONNINGER, G. POPJAK,
G. RYBACK et G.J. SCROEPFER ,
Proc. R. Soc. London, série B, 163, 436 (1965)
- 49- A.S. NARULA et S. DEV ,
Tetrahed. Let., 1733 (1969)
- 50- L.M. BOLGER, H.H. REES, E.L. GHISALBERTI, L.J. GOAD et T.W.
GOODWIN ,
Biochem. J., 118, 197 (1970)
- 51- M. AKHTAR, M.A. PARVEZ et P.F. HUNT
Biochem. J. 106, 623 (1968)
- 52- M. AKHTAR, M.A. PARVEZ et P.F. HUNT ,
Biochem. J., 113, 727 (1969)
- 53- R.D. BENNET et E. HEFTMANN ,
Steroids, 403 (1969)
- 54- J.T. BONNER ,
The Cellular Slime Molds, University Press, Princeton, N.J. (1959)
- 55- G. GERISCH ,
Arch. Entwicklungs-Mechanik, 152, 632 (1960)
- 56- H.E. CARTER et R.C. GAVER
J. Lipid Res., 8, 391 (1967)
- 57- J.J. PAPPAS, W.P. KEAVENEY ,
Tetrahed. Let., 4273 (1966)

TABLE DES MATIERES

	Pages
<u>INTRODUCTION</u>	
- C-méthylation des doubles liaisons carbone-carbone	1
activées.....	2
- Mécanismes de la C-méthylation	8
- Les doubles méthylations	11
<u>PARTIE THEORIQUE</u>	
Chapitre I - Etude de l'incorporation de la méthionine Me-C ² H ₃ dans les stérols du myxomycète <u>Dictyostelium discoideum</u>	15
Chapitre II - Etude de l'incorporation du lanostérol 24- ³ H et 26-27 ¹⁴ C dans les stérols de <u>Dictyostelium</u> <u>discoideum</u>	26
Chapitre III - Etude de l'incorporation du lanostérol 23- ³ H et 26-27 ¹⁴ C dans les stérols de <u>Dictyostelium</u> <u>discoideum</u>	33
Chapitre IV - Etude de la transformation du stigmastanol en stigmasten-22, ol-3β.....	41
<u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	48
PARTIE EXPERIMENTALE	50
CHAPITRE I	52
CHAPITRE II	57
CHAPITRE III	63
CHAPITRE IV	67
BIBLIOGRAPHIE	70

